

UNTERSUCHUNGEN ZUR
GELATINOLYTISCHEN AKTIVITÄT
MENSCHLICHER SPERMATOZOEN

Richard Graßl

1978

Aus der Dermatologischen Klinik und Poliklinik
der Universität München

Direktor: Prof. Dr. O. Braun-Falco

UNTERSUCHUNGEN ZUR GELATINOLYTISCHEN AKTIVITÄT
MENSCHLICHER SPERMATOZOEN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Richard Graßl

aus Dachau

München 1978

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der
Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz.Dr.W.-B. Schill

Mitberichterstatter: Prof.Dr.O. Braun-Falco

Dekan: Prof.Dr.W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 14.11.1978



INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung

2. Literatur

2.1. Akrosom

2.1.1. Akrosomenstruktur

2.1.2. Akrosomale Enzyme

2.1.3. Akrosom und Kapazitation

2.2. Akrosin (EC 3.4.21.10)

2.2.1. Nachweisverfahren

2.2.1.1. Photometrische Testsysteme

2.2.1.2. Gelatinolyse

2.2.1.3. Immunfluoreszenz

2.2.1.4. Elektronenmikroskopie

2.2.2. Biochemische Identifizierung

2.2.2.1. Akrosinisolierung

2.2.2.2. Elektrophoretische Charakterisierung

2.2.2.3. Enzymatische Eigenschaften

2.2.2.4. Quantitative Aktivitätsbestimmung

2.2.3. Biologische Funktion

2.2.3.1. Zona pellucida-Penetration

2.2.3.2. Zervixmukus-Penetration

2.2.3.3. Spermatozoen-Migration

2.2.4. Inhibitoren

2.2.4.1. Hochmolekulare, säurelabile Inhibitoren

2.2.4.2. Niedermolekulare, säurestabile Inhibitoren

2.2.4.3. Akrosin-Inhibitor-Interaktion

2.2.5. Klinischer Bezug

2.2.5.1. Akrosinaktivität

2.2.5.2. Antienzymatische Kontrazeption

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Material und Methoden

- 3.1.1. Humansperma
- 3.1.2. Samenanalyse
- 3.1.3. Quantitative Akrosinbestimmung
 - 3.1.3.1. Akrosinextraktion
 - 3.1.3.2. Bestimmung der Akrosinaktivität
- 3.1.4. Gelatinolyse
 - 3.1.4.1. Prinzip
 - 3.1.4.2. Ejakulat
 - 3.1.4.3. Inhibitoren
 - 3.1.4.4. Gelatinebeschichtung der Objektträger
 - 3.1.4.5. Applikation der Spermatozoen
 - 3.1.4.6. Inkubation
 - 3.1.4.7. Auswertung
 - 3.1.4.8. Statistische Auswertung

3.2. Ergebnisse

- 3.2.1. Vorversuche zur Gelatinolyse
 - 3.2.1.1. Waschung der Spermatozoen
 - 3.2.1.2. Puffer und Inkubationslösungen
 - 3.2.1.3. Stabilität der Lysiszonen
 - 3.2.1.4. Ejakulatalterung
 - 3.2.1.5. Kinetik der Gelatinolyse
 - 3.2.1.6. Einfluß von Spermaplasmaproteasen
 - 3.2.1.7. Fehlerbreite der Gelatinolyse
- 3.2.2. Photometrische Bestimmung der Akrosinaktivität
 - 3.2.2.1. Korrelation zwischen Akrosinaktivität und Spermatozoendichte
 - 3.2.2.2. Statistische Auswertung
- 3.2.3. Gelatinolytische Aktivität der Spermatozoen
 - 3.2.3.1. Korrelation zwischen Akrosinaktivität und Lysisfläche
 - 3.2.3.2. Statistische Auswertung

3.2.4. Beziehung zwischen lysisinaktiven Spermatozoen
und Spermatozoenmorphologie

3.2.5. Einfluß von Akrosininhibitoren auf die Gelatinolyse

3.2.5.1. Hemmstoffzusatz zum Sperma

3.2.5.2. Membransättigung mit Akrosininhibitoren

3.2.5.3. Spermatotoxizität der Inhibitoren

4. Diskussion

5. Zusammenfassung

6. Literaturverzeichnis

Lebenslauf

Abkürzungen

ADH	Alkoholdehydrogenase
AME	L-Arginin-methylester
BAEE	N ^α -Benzoyl-L-argininäthylester
BANA	N ^α -Benzoyl-DL-arginin-β-naphtylamid-hydrochlorid
BAPA	N ^α -Benzoyl-DL-arginin-p-nitroanilid
BLNA	N ^α -Benzoyl-L-lysin-nitroanilid
CPE	corona penetrating enzyme
DF	Dekapazitationsfaktor
DFP	Diisopropylfluorphosphat
E	Extinktion
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
HUSI	<u>H</u> umans <u>s</u> permaplasma <u>i</u> nhibitor
mU	Millieinheiten
NAD	Nicotinamid-adenindinucleotid
p-NPGB	p-Nitrophenyl-p'-guanidinobenzoat (hydrochlorid)
SSPI	<u>S</u> chweines <u>s</u> permaplasma <u>i</u> nhibitor
TAME	N ^α -Tosyl-L-argininäthylester
TLCK	1-chlor-3-tosylamid-7-amino-2-heptanon

1. Einleitung

Die Aufklärung des Fortpflanzungsgeschehens beim Menschen stellt einen Schwerpunkt sexualmedizinischer Forschung dar. Dabei fällt den proteolytischen Enzymsystemen der Genitaltrakte von Mann und Frau große Bedeutung zu. Im männlichen Genitaltrakt unterscheidet man Proteinasen, die aus dem Spermaplasma stammen und proteolytische Enzyme, die in den Spermatozoen lokalisiert sind. In den letzten Jahren ist vor allem der akrosomalen Proteinase Akrosin eine wichtige Rolle innerhalb des Fortpflanzungsgeschehens zuerkannt worden. Man betrachtet Akrosin als das Schlüsselenzym bei der Penetration der Spermatozoen durch die Zona pellucida der Eizelle. Ferner wird eine Beteiligung von Akrosin bei der Passage der Samenzellen durch den Zervixmukus diskutiert. Desweiteren bestehen Hinweise, daß Akrosin als Kininogenase über eine Kininfreisetzung eine Stimulation der Spermatozoenmigration im weiblichen Genitaltrakt bewirkt. Daneben konnte gezeigt werden, daß Akrosin in seinen Funktionen von spezifischen, im Genitaltrakt natürlicherweise vorkommenden Akrosininhibitoren reguliert wird. Diese Hemmstoffe sind in der Lage, selektiv in die proteolytischen Vorgänge im Organismus einzugreifen, wodurch eine lokale als auch zeitliche Begrenzung von proteolytischen Enzymaktivitäten möglich ist. Die gezielte Hemmung von Akrosin als wichtiges Enzym im Befruchtungsvorgang könnte somit einen Ansatzpunkt für eine antienzymatische Kontrazeption darstellen.

Die Beurteilung der Befruchtungsfähigkeit eines Ejakulates wird durch die Charakterisierung bestimmter physikalisch-chemischer Spermaparameter, insbesondere der Bestimmung der Spermatozoendichte, -motilität und -morphologie durchgeführt. Unter den biochemischen Parametern ergibt die Messung der

Initialfruktose Aufschlüsse über die Bläschendrüsensfunktion. Von den Spermatozoenzymen eignet sich die Bestimmung der Akrosinaktivität eines Ejakulates zur Diagnose der Globozoospermie, einem Krankheitsbild, bei dem ausschließlich rundköpfige, akrosomenlose Spermatozoen vorliegen. Neuerdings besteht auch die Möglichkeit, die Akrosinaktivität individueller Spermatozoen mit Hilfe der Gelatinolyse zu bestimmen. Es war daher naheliegend, diese Methode auf ihre Aussagefähigkeit und ihre Anwendbarkeit für die andrologische Diagnostik zu überprüfen.

In der vorliegenden Arbeit sollte vor allem untersucht werden, inwieweit die photometrisch gemessene Akrosinaktivität der Spermatozoenpopulation eines Ejakulates mit der gelatinolytischen Aktivität individueller Spermatozoen korreliert und ob Beziehungen zu verschiedenen spermatologischen Parametern bestehen. Außerdem wurde die Hemmwirkung einiger Akrosininhibitoren auf die Akrosinaktivität ejakulierter menschlicher Spermatozoen im Hinblick auf mögliche kontrazeptive Ansatzpunkte überprüft.

2. Literatur

2.1. Akrosom

2.1.1. Akrosomenstruktur

Der Kopf des menschlichen Spermatozoons wird an seinem vorderen, konisch verlaufendem Anteil von der Kopfkappe, dem Akrosom, bedeckt. Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie gelang es, das Membransystem des Akrosoms darzustellen: der Kern des Spermatozoons ist von einer porenhaltigen Kernmembran umgeben. Der anschließende subakrosomale Raum, der mit einem hellen, fein-granulären Cytoplasma gefüllt ist, wird peripher von der inneren akrosomalen Membran begrenzt. Der akro-

somale Inhalt, der sich zwischen innerer akrosomaler Membran und äußerer akrosomaler Membran befindet, besteht aus relativ homogenem bis fein-granulärem Material. Ferner liegt zwischen der Plasmamembran, die das gesamte Spermatozoon umhüllt, und der äußeren akrosomalen Membran eine schmale Zone, die sich als strukturloses Cytoplasma darstellt. Schließlich unterscheidet man das Äquatorialsegment, das sich aus dem hinteren Anteil der Akrosomenkappe ableitet. Elektronenmikroskopisch stellt es einen verdichteten Abschnitt des akrosomalen Inhalts dar. Die Länge des Äquatorialsegments beträgt etwa 1/8 der Gesamtlänge des Akrosoms (PEDERSEN, 1969; PEDERSEN, 1972a; SCHILL und WOLFF, 1974a,b,c;).

2.1.2. Akrosomale Enzyme

In den Akrosomen von Säugetierspermatozoen konnten bisher folgende Enzyme nachgewiesen werden: saure Phosphatase (TEICHMANN und BERNSTEIN, 1971; YANAGIMACHI und TEICHMANN, 1972), saure Protease, β -Glucuronidase, Ribonuclease, Desoxyribonuclease, Arylsulfatase, Glucosamidase, Spermienneuramidase (DOTT und DINGLE, 1968; ALLISON und HARTREE, 1970; MEIZEL und COTHAM, 1972;), Hyaluronidase (LEWIS und KETCHEL, 1971; ZANEVELD et al., 1973c), ein "corona penetrating enzyme (CPE)" (ZANEVELD und WILLIAMS, 1970b) und Akrosin (STAMBAUGH und BUCKLEY, 1968; ZANEVELD et al., 1969; MULTAMÄKI und NIEMI, 1969; HO und MEIZEL, 1970; GARNER et al., 1971; FRITZ et al., 1972a,b; MEIZEL, 1972; FINK et al., 1972; POLAKOSKI et al., 1972). Einigen Enzymen wurde eine spezifische Funktion beim Befruchtungsvorgang zuerkannt.

Hyaluronidase ermöglicht die Penetration der Samenzellen durch die Zellschicht des Cumulus oophorus der

Eizelle. Zur Eröffnung des Passageweges wird sowohl eine Unterbrechung der Interzellularbrücken (METZ et al., 1972) als auch ein direkter Abbau der Cumuluszellen diskutiert (MANN, 1964; YANAGIMACHI, 1972). Nach Ansicht von ZANEVELD et al. (1973c) kommt den ebenfalls im Akrosom vorkommenden Enzymen N-acetylglucosamidase und β -Glucuronidase bei der Auflösung des Cumulus oophorus durch Hyaluronidase eine unterstützende Funktion zu.

Das "corona penetrating enzyme" wirkt ausschließlich auf die Corona radiata des Eies ein. Der Angriffspunkt des Enzyms dürfte dabei nicht die Coronazelle selbst, sondern deren Interzellularsubstanz sein (ZANEVELD und WILLIAMS, 1970). Das CPE-Enzym wird durch den Dekapazitationsfaktor (DF) des Seminalplasmas gehemmt (CHANG, 1957; WILLIAMS et al., 1969; BHALLA et al., 1972). Dieser CPE-Inhibitor wird wahrscheinlich während des Kapazitationsprozesses im weiblichen Genitaltrakt abgelöst. Erst zu diesem Zeitpunkt kann das CPE-Enzym seine physiologische Wirkung entfalten. Als weiteres akrosomales Enzym zeigt Neuramidase möglicherweise eine dem CPE synergistische Funktion. Auch die Neuramidase wird durch den Dekapazitationsfaktor gehemmt (ZANEVELD et al., 1970a).

1972 gelang es FRITZ et al. (1972a,b) sowie ZANEVELD et al. (1972b) aus menschlichen Spermatozoen Akrosin zu isolieren und zu charakterisieren. Wie bereits gesagt, handelt es sich beim Akrosin um das Schlüsselenzym für die Penetration der Spermatozoen durch die Zona pellucida der Eizelle (SRIVASTAVA et al., 1965; STAMBAUGH und BUCKLEY, 1968; 1969; ZANEVELD et al., 1969; HAENDLE et al., 1970; BEDFORD, 1970). Desweiteren wird ihm eine unterstützende Rolle bei der Passage der Spermatozoen durch den Zervixmukus zugesprochen (SCHUMACHER und ZANEVELD, 1974; NAKAMURA et al.,

1975). Schließlich soll eine Begünstigung der intrauterinen Spermatozoenmigration durch Akrosin bestehen (SCHILL und HABERLAND, 1974; SCHILL et al., 1974; SCHILL, 1975c).

2.1.3. Akrosom und Kapazitation

Ejakulierte Spermatozoen müssen einen physiologischen Reifungsprozeß im weiblichen Genitaltrakt durchlaufen, bevor sie ihre Befruchtungsfähigkeit erlangen. Dieser Vorgang wurde als Kapazitation bezeichnet (AUSTIN, 1951; CHANG, 1951). Uterine und tubale Sekrete sowie Substanzen der Eihülle selbst scheinen den Kapazitationsprozeß der Spermatozoen in Gang zu setzen (HARTMANN und GWATKIN, 1971; FRASER et al., 1971; MIYAMOTO und CHANG, 1972; PAVLOK und Mc.LAREN, 1972; JOHNSON et al., 1972; GWATKIN et al., 1973). Nach AUSTIN (1969) und ZANEVELD et al., (1971c) ist die Kapazitation ein Prozeß, der mit einer Aktivierung akrosomaler Penetrationsenzyme in Verbindung mit der Akrosomenreaktion einhergeht.

Die Akrosomenreaktion beginnt mit der Fusion von Plasmamembran und äußerer akrosomaler Membran. Aus der Verschmelzung beider Membrananteile entstehen Bläschen, die den apikalen Kopfteil des Spermatozoons lose umgeben. Schließlich kommt es zur Ablösung der Akrosomenbläschen, wobei innere akrosomale Membran und Äquatorialsegment erhalten bleiben und der enzymreiche akrosomale Inhalt freigesetzt wird (NICANDER und BANE, 1966; BEDFORD, 1969; 1970; FRANKLIN et al., 1970; YANAGIMACHI und NODA, 1972; JONES, 1973).

BRACKETT et al. (1972) berichteten von einer 4-5 stündigen Inkubation menschlicher Spermatozoen im Uterus eines Rhesusaffen bis es zu einer in vitro Befruchtung eines

menschlichen Eies kam. AUSTIN et al. (1973) beobachteten bei einem in vitro Versuch eine Verzögerung von 7 Stunden zwischen der Zugabe von ejakulierten Spermatozoen zum Kapazitationsmedium und der erfolgten Befruchtung des Eies. Beide Forscher interpretieren die zeitliche Verzögerung zwischen Ejakulation und Befruchtung als Äquivalent des Kapazitationsvorganges.

2.2. Akrosin (EC 3.4.21.10)

2.2.1. Nachweisverfahren

2.2.1.1. Biochemische Analyse

Zwischen den beiden Proteinasen Akrosin und Trypsin besteht eine enge biochemische Verwandtschaft (FRITZ et al., 1973b; FRITZ et al., 1974). Für den photometrischen Nachweis der Akrosinaktivität war es deshalb naheliegend, synthetische Trypsinsubstrate zu verwenden (FRITZ et al., 1971; ZANEVELD et al., 1972a; SCHIESSLER et al., 1972). Die Geschwindigkeit, mit der eine bestimmte Menge Trypsinsubstrat gespalten wurde, erwies sich dabei proportional zur eingesetzten Akrosinmenge. Die einzelnen Forschergruppen erprobten verschiedene Trypsinsubstrate: BAPA, BLNA, BAEE, TAME, BANA, AME. (HO und MEIZEL, 1970; GARNER et al., 1971; MEIZEL, 1972; MULTAMÄKI und MIKKO, 1972; ZANEVELD et al., 1972b; FRITZ et al., 1972a; POLAKOSKI et al., 1972; SCHILL, 1973a; 1974b).

Von den genannten Stoffen erwies sich BAEE als empfindlichstes Substrat für Akrosin, dessen Hydrolyse sowohl direkt als auch indirekt durch eine zweite enzymatische Reaktion bestimmt werden kann. SCHILL (1973a) bevorzugte bei der Bestimmung der Akrosinaktivität im menschlichen Ejakulat

das kombinierte BAEE/ADH Testsystem. Dabei spaltet das in einem essigsaueren Spermatozoenextrakt vorhandene Akrosin das Substrat BAEE. Das während der Reaktion freigesetzte Äthanol bildet mit Hilfe des Coenzyms Nicotinamid-dinucleotid (NAD^+) unter Bildung von Acetaldehyd Nicotinamid-dinucleotid-Wasserstoff (NADH), dessen Extinktion bei 366 nm photometrisch bestimmt wird. Die Fehlerbreite der Methode liegt bei $\pm 7\%$.

2.2.1.2. Gelatinolyse

Akrosin ist als Endoproteinase in der Lage, die natürlicherweise vorkommenden Proteine Casein, Fibrinogen, Hämoglobin, Ribonuklease und Gelatine zu hydrolisieren (SCHIESSLER et al., 1972; ZANEVELD et al., 1972a; MULTAMÄKI und MIKKO, 1972; ZANEVELD et al., 1972b). Die gelatinolytische Wirkung besteht dabei in einer Spaltung der CO-NH-Verbindung von denaturiertem Kollagen, dem Gerüsteiweißstoff von Gelatine. GADDUM und BLANDAU (1970) konnten erstmals den Nachweis der proteolytischen Aktivität von Säugetierspermatozoen auf selbstgefertigten, tuscheimprägnierten Gelatinemembranen erbringen. Unter mikroskopischer Betrachtung fanden sie kreisförmige Verdauungszonen der Gelatineschicht im Kopfbereich der Spermatozoen. Die Lysiszonen waren in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur, dem pH-Wert, der Inkubationsdauer und der Tierspezies von unterschiedlicher Größe. Die Lysisreaktion begann normalerweise im lateralen Anteil des Akrosoms, dem sogenannten Äquatoralsegment, und breitete sich dann gleichmäßig um die Kopfkappe herum aus. Menschliche Spermatozoen zeigten dagegen sofort eine gleichmäßige Halobildung, die vom gesamten Akrosom ausging

(GADDUM-ROSSE und BLANDAU, 1972). Ausgehend von den Arbeiten von GADDUM und BLANDAU konnten in den letzten Jahren mehrere Arbeitsgruppen weitere Aufschlüsse über die proteolytische Aktivität von Säugetier- und Humanspermatozoen mit Hilfe der Gelatinolyse erbringen (BENITEZ-BRIBIESCA und VELAZQUEZ-MEZA, 1972; PENN et al., 1972; ALLEN et al., 1974; TÖRÖK, 1974; WESTFALL und HARRIS, 1974; WENDT et al., 1974; 1975a). Hervorzuheben ist, daß WENDT et al. (1975a) eine Korrelation zwischen der mit Essigsäure extrahierbaren Akrosinaktivität und der Fläche der Lysishöfe nach Gelatinolyse bei Bullenspermatozoen zeigen konnten. Durch den Nachweis der Korrelation mit dem enzymatischen Test und die vollständige Hemmung der gelatinolytischen Aktivität nach vorheriger Sättigung der Gelatinemembranen mit Akrosininhibitoren wurde bewiesen, daß es sich bei dem freigesetzten proteolytischen Enzym um Akrosin handelt (WENDT et al., 1975a,b).

2.2.1.3. Immunfluoreszenz

Durch Immunfluoreszenz konnte die Lokalisation des Akrosins am Akrosom der Spermatozoen nachgewiesen werden. SCHILL et al. (1975a) konnten mit Hilfe monospezifischer Antikörper gegen hochgereinigtes Eberakrosin immunfluoreszenzmikroskopisch Akrosin im Bereich der gesamten Akrosomenkappe bei ejakulierten Spermatozoen des Ebers, des Bullen, des Schafbocks, des Ziegenbocks und des Menschen nachweisen. In ähnlicher Weise gelang GARNER et al. (1975) der Nachweis des Akrosins im Bereich des Akrosoms im Bullenspermatozoon. Immunologische Kreuzreaktionen der Akrosinantikörper mit dem Akrosin von Bulle, Schafsböck, Ziegenböck und Mensch deuten auf die enge molekulare Verwandtschaft der Akrosine

verschiedener Tierspezies hin. Biochemische Extraktionsmethoden in Kombination mit der Immunfluoreszenztechnik gestatteten MORTON (1975) die Zuordnung von Schafsakrosin zur inneren akrosomalen Membran.

2.2.1.4. Elektronenmikroskopie

Zur Feinstruktur des Akrosomenapparates liegen mehrere elektronenmikroskopische Studien vor (NICANDER und BANE, 1966; PEDERSEN, 1969; 1972a; FAWCETT, 1975). So wurde über strukturelle und möglicherweise auch funktionelle Unterschiede der inneren und äußeren Akrosomenmembran nach der essigsäuren Extraktionbehandlung der Spermatozoen berichtet (WOLFF und SCHILL, 1975). BARROS et al. (1967) konnten durch elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen, daß während der Spermatozoenpenetration durch die Zona pellucida infolge der Verschmelzung von Plasmamembran und äußerer Akrosomenmembran (Vesikulation) nur die innere akrosomale Membran und das Äquatorialsegment erhalten bleiben. Da die spaltförmige Öffnung der Zona pellucida für die Spermatozoenpassage durch die enzymatische Aktivität des "Zonalysins" (=Akrosin) bedingt ist (BEDFORD, 1970; SOUPART und STRONG, 1974), lag der Schluß nahe, daß Akrosin mit der inneren akrosomalen Membran assoziiert ist (ZANEVELD et al., 1971a). Kombinierte biochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen erlaubten schließlich eine Zuordnung des Akrosins zur inneren Akrosomenmembran und zum Äquatorialsegment (BROWN und HARTREE, 1974; SCHILL und WOLFF, 1974a,b,c; BROWN et al., 1975). Die Elektronenmikroskopie mit peroxidasemarkierten Antikörpern soll in absehbarer Zeit den direkten Beweis für die exakte Zuordnung des Akrosins zu

subzellulären Strukturen des akrosomalen Membranapparates liefern.

2.2.2. Biochemie

2.2.2.1. Akrosinisolierung

Mit der im folgenden dargestellten Methode gelang die Isolierung des Akrosins aus Eberspermatozoen. Sie erwies sich damit als brauchbares Verfahren für die Akrosinisolierung aller Säugetierspezies einschließlich des Menschen (SCHLEUNING et al., 1973; FRITZ et al., 1974; FRITZ et al., 1975a; SCHLEUNING, 1975; SCHLEUNING und FRITZ, 1976):

- a. Akrosinextraktion gewaschener Spermatozoen mit 2% Essigsäure (pH 2,0-2,7) und nachfolgender Zentrifugation
- b. Ultrafiltration oder Lyophilisation des Überstandes
- c. Abtrennung des Akrosins von anwesenden säurestabilen Proteinase-Inhibitoren mittels Sephadex G-75-Gelfiltration (pH 2,0-2,7)
- d. Affinitätschromatographie unter Verwendung des an Agarose oder Zellulose kovalent gebundenen Trypsininhibitors p-Aminobenzamidin (SCHIESSLER et al., 1972; STAMBAUGH und BUCKLEY, 1972)
- e. Elution bei pH 2,5 und nachfolgendem Entsalzen der Akrosinfraktion über eine Merckogel PGM 2000 Säule
- f. Lyophilisierung des verbleibenden Reaktionsproduktes unter Anwesenheit von 1,5% Saccharose.

Als Ergebnis dieser Isolierung konnte Hochgereinigtes Eberakrosin mit spezifischen Aktivitäten von 18,8 U (BAPA)/mg bzw. 214 U (BAEE/ADH)/mg, pH 8,7 dargestellt werden. Die

zusätzliche Anwendung von Ionenaustauscher- und Gelchromatographie konnte die Reindarstellung von Akrosin nicht verbessern, was als Hinweis für den bereits erreichten hohen Reinheitsgrad gelten mag (SCHLEUNING, 1975).

2.2.2.2. Elektrophoretische Charakterisierung

Menschliches Akrosin läßt sich nach den oben angegebenen Reinigungsschritten mit der Affinitätschromatographie an p-Aminobenzamidin-Sepharose als ein Gemisch elektrophoretisch einheitlicher Formen gewinnen. SCHLEUNING et al. (1976) konnten mittels der Dodecylsulfat-Elektrophorese mindestens vier molekulare Formen abgrenzen. Die Molekulargewichte von drei Formen wurden zu 64000, 38000 und 25000 bestimmt. Dabei ließ sich die hochmolekulare Akrosin-form durch Inkubation in Lösungen mit pH-Werten um 7 in die niedermolekularen Formen überführen.

Frühere Untersuchungen von FRITZ et al. (1975a) führten mit Hilfe der Polyacrylamid-Elektrophorese zu drei gelatinolytisch aktiven Fraktionen des Humanakrosins. Molekulargewichtsbestimmungen in der SDS-Gelelektrophorese ergaben für die hochmolekulare Akrosinkomponente 67000, für die niedermolekulare Komponente 38000. GILBOA et al. (1973) fanden in der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese ein Molekulargewicht von 75000. ZANEVELD et al. (1972a) berichteten über ein Molekulargewicht von 30000 nach Gel-filtration.

Das Auftreten dieser multiplen Formen des Humanakrosins wird damit erklärt, daß Akrosin durch eine begrenzte proteolytische Spaltung einer inaktiven Vorstufe mit höherem Molekulargewicht (Zymogenform) in multiple Akrosinkompo-

nenten mit niedrigerem Molekulargewicht unterteilt wird. Akrosin liegt damit in unterschiedlichen Aktivierungszuständen vor (SCHILL und FRITZ, 1975). Gleichsinnige Schlüsse wurden aus Untersuchungen über Bullenakrosin gezogen (MEIZEL und HUANG-YANG, 1973; POLAKOSKI, 1974; MEIZEL et al., 1974; SCHLEUNING et al., 1976a). Eine teilweise durchgeführte Reinigung von Proakrosin aus Kaninchenhoden entspricht der dargestellten Hypothese (HUANG-YANG und MEIZEL, 1975).

2.2.2.3. Enzymatische Eigenschaften

Die enzymatischen Eigenschaften von Human- und Eberakrosin, und wahrscheinlich auch die der meisten Akrosine anderer Säugetierspezies sind denen von Trypsin aus Rinderpankreas und Schweinepankreas sehr ähnlich. Beide Proteasen sind durch folgende gemeinsame Eigenschaften gekennzeichnet (FRITZ et al., 1973b; FRITZ et al., 1974):

- a. Proteolyse der hochmolekularen Eiweißstoffe Casein, Hämoglobin, Fibrinogen, Ribonuklease und Gelatine
- b. Hydrolyse synthetischer Arginin- und Lysinderivate wie Benzoylargininäthylester, Benzoyllysin-p-nitroanilid und ähnlicher Stoffe
- c. Proteolyse von Kininogenen (PALM und FRITZ, 1975; PALM et al., 1976; SCHILL et al., 1976)
- d. Hemmung durch alle natürlicherweise vorkommenden Trypsinhemmstoffe, mit Ausnahme von HUSI I (Human-spermaplasmainhibitor), der Akrosin nicht hemmt.
- e. Hemmung durch alle hochmolekularen Humanseruminhibitoren wie Alpha₁-Antitrypsin, Inter-Alpha-Trypsin-

Inhibitor, Antithrombin III, Alpha₂-Neuramino-Glykoprotein und Alpha₂-Makroglobulin (FRITZ et al., 1972b, c,d; ZANEVELD et al., 1972a)

f. Hemmung durch synthetische Hemmstoffe wie:

DFP (Diisopropylfluorophosphat)

TLCK (1-Chlor-3-tosylamid-7-amino-2-heptanon)

p-NPGB(p-Nitrophenyl-p-guanidinobenzoat (hydrochlorid))

g. Hemmung durch mikrobielle Peptide wie Leupeptin, Antipain

h. Hemmung durch kompetitive Hemmstoffe wie Benzamidin (SCHIESSLER et al., 1972; ZANEVELD et al., 1972a; FRITZ et al., 1973a; ZANEVELD, 1974)

Ein Unterschied der Proteasen Trypsin und Akrosin besteht in quantitativen Merkmalen:

a. Hohe Affinität von L-Arginin zu Akrosin (POLAKOSKI und Mc.RORIE, 1973)

b. Schwache Hemmung von Akrosin durch Aprotinin (FRITZ et al., 1972b; ZANEVELD et al., 1974)

c. Progressivhemmung von Humanakrosin durch Alpha₁-Antitrypsin. Dieser Hemmstoff bewirkt bei Trypsin eine Soforthemmung (FRITZ et al., 1972d)

d. Permanente Hemmung von Eberakrosin durch den Akrosin-inhibitor aus Eberspermaplasma. Dieser Inhibitor hemmt Trypsin lediglich temporär (TSCHESCHE et al., 1974)

Eine eindeutige Unterscheidungsmöglichkeit beider Proteasen ist durch ihr antigenes Verhalten möglich. Antikörper gegen Humanakrosin reagieren nicht gegen menschliches Pankreatrypsin und umgekehrt. Es besteht also keine Kreuzreaktion (ZANEVELD et al., 1973b).

Eine vorläufige Aminosäuresequenz von Eberakrosin konnte

von SCHLEUNING und FRITZ (1976) angegeben werden. Als auffälliges Merkmal ist der hohe Anteil der Aminosäure Prolin zu werten. Als N-terminale Aminosäure wurde Alanin gefunden. Eine Ähnlichkeit der N-terminalen Aminosäuregruppe im Vergleich mit Trypsin besteht somit nicht, wie sie früher von STAMBAUGH und SMITH (1974) angegeben wurde.

Ein pH-Wert von 8,0 stellt das Reaktionsoptimum von Akrosin dar. Werte unter pH 5 und über pH 10,5 inaktivieren das Enzym. Im neutralen Bereich wird Akrosin bei Anwesenheit von niedermolekularen Akrosininhibitoren durch Bildung von Akrosin-Inhibitor-Komplexen gehemmt (POLAKOSKI et al., 1971). Im sauren Milieu (pH 2,0 - 2,7) dissoziiert dieser Komplex, so daß Akrosin in stabilisierter Form als freies, jedoch inaktives Enzym vorliegt (FINK et al., 1973; ZANEVELD et al., 1973a; SCHLEUNING und FRITZ, 1974).

Die Dissoziationskonstanten K_i der Komplexe von Eberakrosin mit Leupeptin betrugen $8,6 \times 10^{-8} \text{M}$ und mit Antipain $7,1 \times 10^{-8} \text{M}$, soweit sie unter Verwendung des Substrates BAEE bestimmt wurden (FRITZ et al., 1973a). Als Michaelis-Konstante K_M für Humanakrosin bei Verwendung von L-BAEE ergab sich $2,8 \times 10^{-8} \text{M}$, für Eberakrosin $4,8 \times 10^{-5} \text{M}$ (GILBOA et al., 1973; SCHLEUNING und FRITZ, 1974). Akrosin ist bei 4°C und pH 2,4 über mehrere Wochen stabil. pH-Werte zwischen 6,5 - 8,0 reduzieren die Stabilität auf maximal 24 Stunden. Die Aktivität und Stabilität von Akrosin wird durch Metallsalze, Metallchelatbildner und Sulfhydrylreagentien folgendermaßen beeinflusst:

- a. Keine signifikante Beeinflussung der Enzymaktivität durch Metallionen: KCN; CuCl_2 ; MnCl_2 ; CaCl_2 ; NiCl_2 ;
 MgCl_2 ; CoCl_2 ;
Chelatbildner: EDTA

Sulphydrylreagentien: 1, 10, Phenanthrolin;
Jodazetat; Cystein; Dithiothreitol;
Merkaptoäthanol;

- b. Signifikante Hemmung der Enzymaktivität durch HgCl_2
(POLAKOSKI und MC.RORIE, 1973; SCHLEUNING und FRITZ,
1976).

Das Arbeiten mit hochgereinigtem Akrosin setzt silikonisierte Glaswaren oder Plastikmaterial voraus, da Akrosin an Glasoberflächen anhaftet und sich somit dem Nachweis entzieht (FRITZ et al., 1972a).

2.2.2.4. Quantitative Bestimmungsmethode

Die quantitative Bestimmung der Akrosinaktivität war zunächst aus zweierlei Gründen erschwert. Die bekannten akrosomalen Extraktionsverfahren, wie mechanische Manipulation, Detergentien, Tiefgefrieren, hypoosmotischer Schock und Ultraschall waren einerseits nicht geeignet, Akrosin im originären Zustand vorliegen zu lassen. Andererseits ergab die chromatographische Abtrennung der Akrosinhemmstoffe, wie sie im Spermatozoon und Seminalplasma vorhanden sind, aus verfahrenstechnischen Gründen hohe Verluste an vorhandenen Akrosinaktivitäten.

FINK et al. (1972) waren es schließlich, die der quantitativen Akrosinbestimmung durch eine essigsaure Akrosin-Extraktionsmethode neue Impulse verliehen. Durch Kombination mit einem empfindlichen photometrischen Testsystem wurde die quantitative Erfassung der Akrosinaktivität aus einer Spermatozoenpopulation ermöglicht (FRITZ et al., 1972a; SCHILL, 1973a; 1974a,b).

Der entscheidende Vorteil der essigsauren Akrosinextraktion

gegenüber anderen Extraktionsverfahren besteht darin, daß das Enzym bei pH 2,4 in stabilisierter, enzymatisch inaktiver Form vorliegt, so daß eventuell stattfindende Abbau- oder Aktivierungsvorgänge am Akrosin unterbunden werden. Ferner bewirkt das saure Milieu eine vollständige Dissoziation von Akrosin-Inhibitor-Komplexen, wie sie bei allen Extraktionsverfahren entstehen (POLAKOSKI et al., 1971). Der essigsäure akrosomale Extrakt kann somit direkt in das photometrische Testsystem eingesetzt werden, ohne daß der gleichfalls vorhandene Akrosininhibitor die Aktivitätsbestimmung beeinflusst.

Zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität von Akrosin eignet sich die Hydrolyse des synthetischen Substrates BAEE. Die Esterspaltung kann einmal direkt bei 253 nm gemessen werden (BAEE-Test) oder indirekt durch Bestimmung des freigesetzten Äthanolis mittels Alkoholdehydrogenase (BAEE/ADH-Test) (FRITZ et al., 1972a). Ein Vergleich beider Testansätze zeigte, daß die indirekte Bestimmungsmethode um ein Dreifaches empfindlicher und weniger stör anfällig ist. Mit dem BAEE/ADH-Test läßt sich die Akrosinaktivität von wenigstens 3 - 5 Mill. Spermatozoen pro ml nachweisen. Bei Spermatozoendichten unter 40 Mill/ml wird empfohlen, aus Präzisionsgründen den Testansatz des Ejakulates von 0,25 ml auf 1 ml zu erhöhen. Das Ergebnis kann rechnerisch korrigiert werden (SCHILL, 1973a).

2.2.3. Biologische Funktion

2.2.3.1. Zona pellucida Penetration

In den letzten Jahren konnte durch zahlreiche Untersuchungen die spezifische Funktion des Akrosins bei der Penetra-

tion der Spermatozoen durch die Zona pellucida der Eizelle nachgewiesen werden. Man betrachtet heute Akrosin als das Schlüsselenzym der Zona pellucida-Penetration. Den lytischen Effekt der akrosomalen Proteinase auf die Zona pellucida wiesen SRIVASTAVA et al. (1965) und später STAMBAUGH und BUCKLEY (1968, 1969) in vitro nach. ZANEVELD et al. (1969) und HAENDLE et al. (1970) bestätigten diese Beobachtungen. BEDFORD (1970) dacht aufgrund seiner elektronenmikroskopischen Untersuchungen an das Vorhandensein eines "Zonolysins".

Akrosin als auch Trypsin vermögen die Wandstruktur der Zona pellucida, die aus Sialo-Glykoprotein besteht, zu hydrolisieren (UHLENBRUCK et al., 1971; HO und MEIZEL, 1975). Die Spermatozoen haften zunächst in loser Weise an die Zona pellucida an (nicht speziesspezifisch). Nach einem Signalaustausch zwischen Eizelle und Spermatozoen kommt es zu einer speziesspezifischen, festen Bindung. Für diese Bindung nimmt man spezifische Rezeptoren an (HARTMANN und GWATKIN, 1971; HARTMANN und HUTCHINSON, 1974). Durch die hydrolytische Wirkung des Akrosins entstehen in der Folge Spalträume in der Zona pellucida. Unter aktiver Propulsivbewegung passieren schließlich die Spermatozoen die Zona pellucida als letzte große Barriere der Eizelle. Synthetische und natürlicherweise vorkommende Akrosininhibitoren sind in der Lage, diesen enzymatisch induzierten Penetrationsvorgang der Spermatozoen in vitro und in vivo zu hemmen. Eine Befruchtung wird somit verhindert (STAMBAUGH und BUCKLEY, 1968; 1969; STAMBAUGH et al., 1969; HAENDLE et al., 1970; ZANEVELD et al., 1970a,b; 1971a,b; SUOMINEN et al., 1973; POLAKOSKI und WILLIAMS, 1974; ZANEVELD, 1974; YANG et al., 1976).

Schließlich wird eine Beteiligung von Akrosin am Polysper-

mieblock diskutiert (CONRAD et al., 1971; GWATKIN et al., 1973). Die Abklärung des genauen Reaktionsgeschehens bedarf jedoch noch weiterer Untersuchungen.

Auch im Ooplasma der Eizelle, in den sog. cortical granules, wurde eine trypsinähnliche Proteinase nachgewiesen (GWATKIN et al., 1973), die nach dem Eindringen des zur Befruchtung führenden Spermatozoons in den perivitellinen Raum freigesetzt wird und zur Zonareaktion führt (BARROS und YANAGIMACHI, 1971; VACQUIR et al., 1972).

2.2.3.2. Zervixmukus-Penetration

Für die Penetration der Spermatozoen durch das aus Sialoglykoprotein aufgebaute, mizelluläre Netzwerk des Zervixmukus sind mehrere zyklusabhängige Faktoren entscheidend. Günstige physikalisch-chemische Mukusverhältnisse und eine vorwärts gerichtete Eigenbewegung der Spermatozoen sind wichtigste Voraussetzungen für eine Penetration des Zervixmukus (SCHILL, 1973b). Weiterhin soll das im Spermaplasma vorhandene chymotrypsinähnliche Enzym Seminin eine begrenzte Proteolyse des Zervixmukus bewirken, was experimentell durch das Verschwinden des Farnkrautphänomens und im Auftreten verbesserter rheologischer Eigenschaften seinen Ausdruck findet (MOGHISSI und SYNER, 1970; ZANEVELD et al., 1974; SCHILL, 1975a). Schließlich wird ein proteolytischer Effekt durch das spermatozoenspezifische Akrosin auf den Zervixmukus angenommen. NAKAMURA et al. (1975) konnten eine signifikante Viskositätsänderung des Zervixmukus durch Akrosinzusatz zeigen. SCHUMACHER und ZANEVELD (1974) gelang der Nachweis einer signifikanten Hemmung der Spermatozoonpenetration durch den Zervixmukus sofern hohe

Konzentrationen an Akrosininhibitoren dem Spermaplasma zugesetzt wurden. Diese Ergebnisse führten zu der Hypothese, daß Akrosin während des Penetrationsvorganges zunächst aus "Pionierspermatozoen" freigesetzt wird. Durch die viskositätsmindernde Wirkung können auf diese Weise für nachfolgende Spermatozoen bessere Passagebedingungen geschaffen werden.

2.2.3.3. Spermatozoen-Migration

Akrosin ist als potente Kininogenase in der Lage, aus Kininogenen pharmakologisch wirksame Kinine freizusetzen (PALM und FRITZ, 1975). Es konnte gezeigt werden, daß Kinine die Spermatozoenmotilität quantitativ und qualitativ begünstigen (SCHILL und HABERLAND, 1974; SCHILL et al., 1974; SCHILL, 1975c). Das Substrat Kininogen, aus dem die Kininfreisetzung erfolgt, ist auch im Spermaplasma und im Zervixmukus vorhanden. Sehr wahrscheinlich kommt es auch im Uterus und Tubensekret vor (PALM et al., 1975). Somit scheint es möglich, daß Akrosin, welches im weiblichen Genitaltrakt aus degenerierten Spermatozoen freigesetzt wird, über eine Kininfreisetzung eine Stimulation der Motilität der in utero vorhandenen Spermatozoen bewirkt. Es wäre auch vorstellbar, daß eine Diffusion oder ein aktiver Transport des ubiquitär vorkommenden Kininogens in das Akrosom stattfindet. Dabei würde die Kininfreisetzung innerhalb des Akrosoms erfolgen. Der Nachweis, daß Akrosin unter physiologischen Bedingungen eine Freisetzung von Kininen bewirkt, steht allerdings noch aus.

Im männlichen Genitaltrakt kommt eine Freisetzung von Kininen nicht in Frage, da die hohe Konzentration des

säurestabilen Akrosininhibitors HUSI-II freies Akrosin sofort durch Bildung eines Akrosin-Inhibitor-Komplex inaktiviert. Im Gegensatz dazu ist im weiblichen Genitaltrakt, vor allem im Zervixmukus, der Akrosinhemmstoff HUSI-II nicht vorhanden, so daß freies Akrosin seine proteolytische Wirkung voll entfalten kann (WALLNER und FRITZ, 1974; WALLNER et al., 1975). Auch die hochmolekularen Proteinaseinhibitoren des Zervixmukus sind zum Ovulationstermin nur in Spuren nachweisbar, weshalb eine Akrosinhemmung ebenfalls ausgeschlossen ist (SCHUMACHER, 1973; SCHUMACHER und ZANEVELD, 1974). Alpha₁-Antitrypsin, das in uterinen Sekreten vorhanden ist und eine langsame Akrosinhemmung bewirkt, kommt aus Gründen der niedrigen Konzentration für eine wirksame Akrosininaktivierung ebenfalls nicht in Frage (HIRSCHHÄUSER et al., 1971; SCHUMACHER, 1971; STAMBAUGH et al., 1974; FRITZ et al., 1976a).

2.2.4. Inhibitoren

Wie unter 2.2.2.3. bereits gesagt, sind die enzymatischen Eigenschaften von Akrosin und Trypsin sehr ähnlich. Alle natürlicherweise vorkommenden bzw. synthetischen Trypsininhibitoren sind deshalb dazu geeignet, Akrosin zu hemmen. Eine Ausnahme bildet der menschliche Trypsininhibitor HUSI-I, der keine Akrosinhemmung bewirkt.

2.2.4.1. Hochmolekulare, säurelabile Inhibitoren

Im menschlichen Organismus existieren hochmolekulare und niedermolekulare Proteinase-Inhibitoren. Die hochmolekularen

Inhibitoren stammen aus dem Serum und stellen ein Produkt der Serumtranssudation dar, dem kein spezieller Sekretionsort im Genitaltrakt zugrunde liegt. Im Seminalplasma des Mannes wurde hochmolekulares Alpha_1 -Antitrypsin (HERRMANN und HERMANN, 1969; SCHUMACHER, 1969; SCHILL und SCHUMACHER, 1973) und $\text{Alpha}_{1,x}$ -Antichymotrypsin nachgewiesen (ZANEVELD et al., 1974; SCHILL, 1976b). Alpha_1 -Antitrypsin stellt für Akrosin einen Progressivinhibitor dar, der aber nur in geringer Konzentration vorliegt (SCHUMACHER, 1971; FRITZ et al., 1972d). Für die Regulation der Akrosinaktivität ist er somit von geringer Bedeutung. Die biologische Funktion von Alpha_1 -Antitrypsin und $\text{Alpha}_{1,x}$ -Antichymotrypsin besteht in einer Schutzwirkung gegenüber Leukozytenproteinase wie sie hauptsächlich im Rahmen von Entzündungsprozessen im Genitaltrakt vorkommen (OHLSSON, 1974).

Im Zervixmukus des Menschen wurden die hochmolekularen Serum-inhibitoren Alpha_1 -Antitrypsin, $\text{Alpha}_{1,x}$ -Antichymotrypsin, Inter- Alpha -Trypsininhibitor, Alpha_2 -Neuraminoglykoprotein und Antithrombin III gefunden (SCHUMACHER, 1973). Ihre Konzentrationen sind zyklusabhängig. Zum Zeitpunkt der Ovulation sind sie nicht mehr oder nur in Spuren vorhanden, so daß eine wirksame Akrosinhemmung nicht möglich ist (SCHUMACHER, 1973). Ihre klinische Bedeutung besteht in einer protektiven Funktion gegenüber dem Zervix-epithel durch Inaktivierung freier Leukozytenproteinasen im Verlauf von Entzündungsprozessen.

2.2.4.2. Niedermolekulare, säurestabile Inhibitoren

Im Gegensatz zu den hochmolekularen Hemmstoffen sind die niedermolekularen Proteinase-Inhibitoren säurestabil. Sie

stellen ein spezifisches Sekretionsprodukt des Genitaltraktes dar, vor allem der Bläschendrüsen und des Zervixepithels (HAENDLE et al., 1965; WALDSCHMIDT et al., 1966; FRITZ et al., 1968; FINK et al., 1971; HIRSCHHÄUSER und KIONKE, 1971; ZANEVELD et al., 1971a; SUOMINEN und NIEMI, 1972; WALLNER und FRITZ, 1974). Die niedermolekulare Inhibitorfraktion des männlichen Seminalplasmas besteht aus zwei unterschiedlichen Trypsin-Hemmstoffen. Humanspermaplasmainhibitor I (HUSI-I) ist ein Trypsin-Chymotrypsin-Hemmstoff mit einem Molekulargewicht von 10130. Unter physiologischen Bedingungen hemmt er vor allem neutrale Leukozytenproteinasen mit chymotrypsin- und elastaseähnlicher Aktivität, wie sie bei männlicher Adnexitis vorkommen (SCHIESSLER et al., 1974; 1975; FRITZ et al., 1975b). Akrosin und das chymotrypsinähnliche Enzym Seminin werden von HUSI-I nicht gehemmt.

Der Humanspermaplasmainhibitor II (HUSI-II) stellt einen Trypsin-Akrosin-Inhibitor dar. Sein Molekulargewicht beträgt 6319 (SCHIESSLER et al., 1974; 1975). Als wirkungsvoller Akrosinhemmstoff ist er ein physiologischer Antagonist zu Akrosin. Die Akrosinhemmung wird durch die Bildung eines Akrosin-Inhibitor-Komplexes bewirkt (SCHILL, 1976a). Die Komplexbildung verläuft unter physiologischen Bedingungen sehr schnell, die Dissoziation dagegen äußerst langsam (FRITZ et al., 1975b; 1976a). HUSI-II schützt den männlichen Genitaltrakt vorzugsweise vor der zerstörerischen Wirkung freien Akrosins aus gealterten oder degenerierten Spermatozoen (SCHIESSLER et al., 1974; FRITZ et al., 1975b). Das Fehlen geeigneter Akrosinhemmstoffe hätte durch den Abbau von Strukturproteinen, durch die Hydrolyse löslicher Proteine und durch die Freisetzung von Kininen eine massive Entzündungsreaktion zur Folge (FREY et al., 1968; ERDÖS, 1970).

Im menschlichen Zervixmukus existiert ebenfalls ein niedermolekularer, säurestabiler Trypsin-Inhibitor. Dieser ist mit HUSI-I identisch. Die Konzentration dieses Zervixinhibitors erreicht während der ovulatorischen Phase ein relatives Maximum (WALLNER und FRITZ, 1974). Der niedermolekulare Zervixmukus-Inhibitor schützt die Genitalschleimhaut der Frau vor der aggressiven Wirkung freier Proteinasen, wie z.B. Elastase und chymotrypsinähnlicher Proteinasen, wie sie durch den Zerfall von Leukozyten bei entzündlichen Genitalinfektionen freigesetzt werden (WALLNER et al., 1975; FRITZ et al., 1975b).

2.2.4.3. Akrosin-Inhibitor-Interaktion

Das Verhalten der Proteinase Akrosin und seiner spezifischen Inhibitoren zueinander ist von mehreren Arbeitsgruppen untersucht worden (ZANEVELD et al., 1970a; 1971a,b,c; 1972a; 1973a; 1974; ZANEVELD und WILLIAMS, 1970; SRIVASTAVA et al., 1974; BROWN et al., 1975; FRITZ et al., 1972b,c,d; 1973a,b; 1975b; 1976a; WENDT et al., 1975a,b; SCHILL et al., 1975b; SCHILL, 1976b). Es wird angenommen, daß Akrosin vorwiegend als Proenzym bzw. in einem teilaktivierten Zustand an der inneren akrosomalen Membran und am Äquatorialsegment gebunden vorkommt, während die Akrosininhibitoren mit anderen Strukturen des Akrosoms (Plasmamembran und äußere akrosomale Membran) assoziiert sind. Die Entstehung des bereits erwähnten Akrosin-Inhibitor-Komplexes ist somit nur möglich, wenn es zu einer Zerstörung der akrosomalen Membransysteme kommt und Akrosin für freie Inhibitoren zugänglich wird. Die physiologische Bedeutung der Akrosininhibitoren ist daher hauptsächlich in einer Schutzfunktion gegenüber Akrosin zu

sehen, das am falschen Ort und zur falschen Zeit im Genitaltrakt freigesetzt wird (HUSI-II). Zusätzlich schützen HUSI-I, der niedermolekulare Zervixinhibitor sowie die hochmolekularen Inhibitoren aus Seminalplasma und Zervixmukus den Genitaltrakt vor freien, proteolytischen Enzymaktivitäten, wie sie im Verlauf von Entzündungsprozessen auftreten können.

An Hand von Tierversuchen wurde postuliert, daß Akrosin-inhibitoren während des Ejakulationsvorganges an das Akrosom angelagert und im Verlauf der Uteruspassage wieder abgelöst werden. Erst die Entfernung der Akrosininhibitoren während des Kapazitationsprozesses würde schließlich die Spermatozoen befähigen, die Zona pellucida zu durchdringen (ZANEVELD, 1969; SCHILL et al., 1975b). Inwieweit menschliche Akrosinhemmstoffe am Kapazitationsprozeß der Spermatozoen beteiligt sind, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

2.2.5. Klinischer Bezug

2.2.5.1. Akrosinaktivität

Der andrologischen Diagnostik mangelt es bislang an strengen und zuverlässigen Kriterien zur exakten Bestimmung der Fertilität des Mannes (KRAUSE und GLAHN, 1974; SCHIRREN, 1975). Die international festgelegten Normwerte als Richtgrößen für die Fertilitätsdiagnostik (EMPFEHLUNGEN zur Nomenklatur in der Andrologie (1970)) sind in ihrer Aussagekraft in sofern beschränkt, als sie lediglich statistisch belegte Fertilitätsparameter darstellen und somit für den Einzelfall keine relevante Aussage erlauben. Es ist daher für die andrologische Diagnostik von entscheidender

Bedeutung, nach weiteren aussagekräftigen Parametern zu suchen. So bestehen z.B. Ansätze, das Enzym Akrosin als biochemischen Parameter für die Fertilitätsdiagnostik zu überprüfen. Man erhofft sich durch die Bestimmung der Akrosinaktivität weitere Aufschlüsse über das Penetrationsverhalten der Spermatozoen. Erste Versuchsergebnisse zur Bestimmung der Korrelation von Akrosinaktivitäten zu verschiedenen Spermaparametern liegen bereits vor (SCHIRREN und EWEIS, 1973; SCHILL, 1973a; 1974b; 1976a).

Es bedarf aber weiterer Untersuchungen, um die Bestimmung der Akrosinaktivität als aussagekräftigen biochemischen Parameter für die klinisch andrologische Diagnostik verwerten zu können. Es sind vor allem noch unbekannte Membranfaktoren und aktivierbare Zymogenmoleküle, die mit der quantitativen Extraktion der Proteinase aus den Spermatozoen interferieren. Eine klare diagnostische und prognostische Aussage zu Fertilitätsproblemen ist durch die Bestimmung der Akrosinaktivität zum gegenwärtigen Zeitpunkt nur bei der Globozoospermie möglich, einem Krankheitsbild, bei dem ausschließlich akrosomenlose Kugelkopfspermatozoen vorliegen (HOLSTEIN et al., 1973a,b; SCHILL, 1976c; WOLFF et al., 1976).

2.2.5.2. Antienzymatische Kontrazeption

Die vielfältige Suche nach einer nicht hormonell gesteuerten Kontrazeptionsmethode lenkte die Aufmerksamkeit auch auf die Möglichkeit einer antienzymatischen Kontrazeption (FRITZ et al., 1973b; ZANEVELD, 1974; SCHILL, 1975b). Akrosin käme dabei als Schlüsselenzym der Zona Pellucida-Penetration für eine antienzymatische Kontrazeption in

Frage. Erste Versuchsansätze bestehen in einer Akrosin-hemmung durch spezifische Antikörper sowie mit Hilfe spezifischer Akrosininhibitoren (ZANEVELD et al., 1973b). Eine antienzymatische Kontrazeption ist theoretisch bereits beim Mann durch eine Akrosinhemmung im Hoden und Nebenhoden möglich, einfacher jedoch bei der Frau durch die Hemmung des Akrosins innerhalb der Zervix, im Uterus oder in den Tuben durchführbar.

Die gezielte Kontrolle der Akrosinaktivität mittels niedermolekularer Inhibitoren setzt voraus, daß diese Stoffe Plasmamembran und äußere akrosomale Membran penetrieren können, um Akrosin an der inneren akrosomalen Membran zu erreichen. Von den bisher getesteten Substanzen scheint lediglich p-NPGB, ein synthetischer Akrosininhibitor in hoher, toxischer Dosis in der Lage zu sein, die äußeren Membranen des Akrosoms von Eberspermatozoen passieren zu können (WENDT et al., 1975b). DFP, TLCK, Leupeptin, Antipain sowie alle natürlicherweise vorkommenden Akrosinhemmstoffe besitzen diese Fähigkeit, soweit es Eberspermatozoen betrifft, nicht.

Die natürlichen Membranbarrieren am Spermatozoon könnten umgangen werden, sofern es gelingt, Akrosin im weiblichen Genitaltrakt im Verlauf der Kapazitation kurz vor der Penetration der Spermatozoen durch die Zona pellucida zu hemmen. In dieser Phase liegt das Enzym leicht zugänglich an der inneren akrosomalen Membran vor, da alle äußeren Membranbestandteile bereits abgelöst sind (ZANEVELD et al., 1971a; SUOMINEN et al., 1973; YANG et al., 1976).

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Material und Methoden

3.1.1. Humansperma

Es wurden hauptsächlich Ejakulate von Patienten der andrologischen Sprechstunde der Dermatologischen Universitätsklinik München, teilweise aber auch von freiwilligen Spendern verwendet. Die sexuelle Karenzzeit betrug meist 5 Tage. Gelegentlich lagen auch kürzere sowie längere Karenzzeiten vor (Maximal zwei Tage - drei Wochen). Das Sperma wurde durch Masturbation gewonnen und in einem sterilen Spitzglas bei Zimmertemperatur bis zur Verwendung aufbewahrt. Zwischen der Gewinnung des Spermas und der jeweiligen Untersuchung vergingen je nach Versuchsansatz 30 Minuten bis 3 Stunden.

Für statistische Auswertungen erfolgte die Unterteilung der einzelnen Ejakulate gemäß den Empfehlungen des European Andrology Club: Normozoospermie, Oligozoospermie, Asthenozoospermie, Polyzoospermie, Teratozoospermie und Azoospermie.

3.1.2. Samenanalyse

Die Samenanalyse umfaßte die folgenden Bestimmungen: Ejakulatvolumen, pH-Wert, Viskosität, Verflüssigungszeit, Spermatozoendichte, -motilität und -morphologie, sowie Initialfruktose nach Methoden von SCHIRREN (1971) und ELIASSON (1971). Diese Bestimmungen wurden von erfahrenen medizinisch-technischen Assistentinnen durchgeführt.

3.1.3. Quantitative Akrosinbestimmung

Die quantitative Bestimmung der Akrosinaktivität am Einzel-ejakulat erfolgte nach der von SCHILL angegebenen Methode (SCHILL, 1973a).

Die Versuchsausrüstung bestand aus einem Eppendorf-Photometer 1101 M mit Küvettenautomatik, Thermokonstanz (Wasserbad) und Extinktionsschreiber (Kienzle D 24). Als Zentrifuge stand die Heraeus-Minifuge mit variierbaren Beschleunigungswerten und Temperaturwahl zur Verfügung (600 g bzw. 12000 g; 4°C). Für das photometrische Testsystem wurden folgende Substanzen benötigt:

N^α-Benzoyl-L-argininäthylester (BAEE)¹;

Alkoholdehydrogenase (ADH)²;

β-Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD⁺)³;

Tetra-Sodium-diphosphat-10-hydrat (Na₄P₂O₇)⁴

Semicarbazid-hydrochlorid⁵;

Glycin p.a.⁶

2N NaOH

0,15 M NaCl

2% Essigsäurelösung

Die Methode der quantitativen Akrosinbestimmung gliedert sich arbeitstechnisch in 2 Schritte:

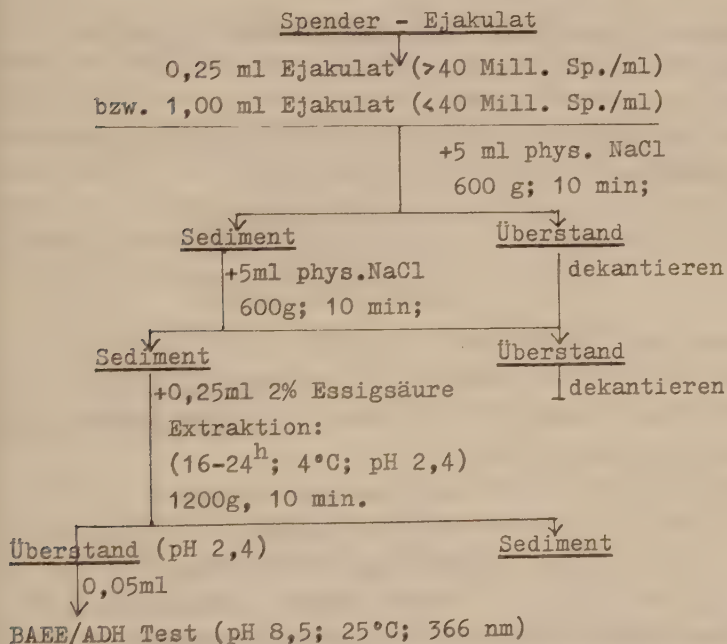
- 1) Extraktion des Akrosins aus dem Spermatozoenakrosom.
- 2) Bestimmung der Akrosinaktivität mittels Photometer.

3.1.3.1. Akrosin-Extraktion

Je nach Spermatozoendichte wurden als Doppelansatz in einem Zentrifugenröhrchen je 0,25 ml (>40 Mill. Spermatozoen/ml) bzw. je 1 ml (<40 Mill. Spermatozoen/ml) des zu unter-

suchenden Ejakulates durch zweimaliges Waschen mit 5 ml einer physiologischen Kochsalzlösung (600 g, 4°C, 10 Minuten) vom Seminalplasma befreit. Das Spermatozoensediment wurde mit 0,25 ml einer 2% igen Essigsäure versetzt und bei 4°C für 16 -24 Stunden inkubiert. Nach Zentrifugation der essigsauren Spermatozoensuspension (1200 g, 4°C, 10 Minuten) wurde der Überstand bei -28°C bis zur Bestimmung der Akrosinaktivität aufbewahrt.

Abb. 1: Arbeitsgang zur Akrosinextraktion menschlicher Spermatozoen für den kombinierten BAEE/ADH Test.



3.1.3.2. Bestimmung der Akrosinaktivität

Als empfindliches Testsystem zur Bestimmung der Akrosinaktivität wurde der kombinierte BAEE/ADH-Test (TRAUTSCHOLD und WERLE, 1961; TRAUTSCHOLD et al., 1970; FRITZ et al., 1972a) verwendet.

Prinzip:
$$\text{BAEE} \xrightleftharpoons{\text{Akrosin}} \text{Benzoylarginin} + \text{Äthanol}$$
$$\text{Äthanol} + \text{NAD}^+ \xrightleftharpoons{\text{ADH}} \text{Acetaldehyd} + \text{NADH} + \text{H}^+$$

Über die photometrisch gemessene Extinktionsänderung des gebildeten NADH ist die Berechnung der Akrosinaktivität möglich. Die photometrische Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 366 nm, pH 8,5 und 25°C.

Die Testsubstanzen wurden nach folgender Vorschrift gelöst:

BAEE: 10 mg/10ml destill. Wasser

NAD⁺: 20 mg/1 ml destill. Wasser

ADH : Konzentrierte Suspension, (Boehringer Mannheim)

Pyrophosphatpuffer: 15,2 g Na₄P₂O₇

4,1 g Semicarbazid

0,9 g Glycin

ad 500ml Aqua dest.

Der Puffer wurde mit 2 N NaOH auf pH 8,7 eingestellt. Alle Reagenzien wurden im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Während der Enzymbestimmung standen die Substanzen in einem Eisbad.

Der Testansatz pro Küvette betrug:

0,1 ml NAD⁺ - Lösung

2,35 ml Puffer

0,5 ml BAEE - Lösung

0,02 ml ADH - Suspension

Die Pufferlösung mußte bereits vor Beginn der Enzymbestimmung auf 25°C erwärmt werden. Es wurden Plastikkuvetten

benutzt, um eine Adsorption des Enzyms an der Küvettenwand zu vermeiden. Nach behutsamen Mischen der Testsubstanzen in der Küvette wurden sie bei 25°C für 5 Minuten vorinkubiert. Durch Zugabe von 0,05 ml essigsäurem Extrakt (Enzymlösung) wurde die Reaktion gestartet. Die Extinktionszunahme des Reaktionsgemisches wurde im Abstand von 1 Minute über einen Zeitraum von 10 Minuten registriert. Als Leerwert diente 0,05 ml einer 2% igen Essigsäure. Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte nach der Formel:

$$\frac{\Delta E \text{ Probe}/10 \text{ min.} - \Delta E \text{ Leerwert}/10 \text{ min.}}{0,011} \times 20 = \text{mU/ml}$$

Der Faktor 0,011 entspricht der Tatsache, daß 1 mU Akrosin bei der BAEE/ADH Spaltung eine Extinktionsänderung von 0,011 $\Delta E/10 \text{ min.}$ bzw. 0,0011 $\Delta E/\text{min.}$ bewirkt. Faktor 20 resultiert aus der Umrechnung von 0,05 ml Akrosinextrakt pro 0,25 ml Einsatzvolumen bezogen auf 1 ml Ejakulatvolumen. Das Ergebnis der Akrosinaktivität pro ml Ejakulat (mU/ml) kann unter Einbeziehung der Spermatozoendichte in $\text{mU}/10^6$ Spermatozoen ausgedrückt werden.

3.1.4. Gelatinolyse

3.1.4.1. Prinzip

Die Methode der Gelatinolyse von Säugetierspermatozoen auf Gelatineplatten geht auf die Arbeiten von GADDUM und BLANDAU (1970) und GADDUM-ROSSE und BLANDAU (1972) zurück. Die Durchführung der eigenen Versuche erfolgte nach der von PENN und WENDT angegebenen Methode zur Gelatinolyse mit autoradiographischen Gelatine-Film-Platten (PENN et al., 1972; WENDT, 1974; WENDT et al., 1975a,c).

Das Prinzip der Gelatinolyse beruht auf einer Depolymerisation der Gelatineschicht durch die proteolytische Wirkung des akrosomalen Enzyms Akrosin. Die durch die Vorbehandlung der Photoplaten gebildeten Silbergranula auf der Filmschicht der autoradiographischen Gelatineplatten werden durch die Depolymerisation der Gelatineschicht freigesetzt. Sie diffundieren dabei mit dem Enzym und führen durch Anlagerung im Bereich der Ränder der Lysishöfe zu einer Kontraststeigerung, so daß kreisförmige Aufhellungszonen entstehen (Halobildung). Unter dem Mikroskop sind die Halos an der vermehrten Lichtdurchlässigkeit des Strahlenkegels zu erkennen. Sie stellen sich als rundliche, helle, scharfbegrenzte Auflösungszonen im Bereich der Spermatozoenköpfe dar.

Für die Methode der Gelatinolyse wurden folgende speziellen Geräte und Materialien benötigt:

Brutschrank (37°C)

feuchte Kammer (94% Luftfeuchtigkeit)

Phasenkontrastmikroskop

Kodak AR-10 autoradiographic stripping plates 4 3/4 x
6 1/2 inch

Kodak D-19-Developer (4,5 Liter)

Kodak Unifix Powder

3.1.4.2. Ejakulat

Je nach Versuchsprogramm wurden sowohl Nativsperma als auch gewaschene Spermatozoen auf ihre Lysiswirkung untersucht.

Die Bestimmung der Lysisflächen und die Ermittlung der Angehrate lysisaktiver Zellen erfolgte an Hand von unge-

waschenen Ejakulaten (vgl. 3.2.2.1.). Zwischen Spermagewinnung und Testung der Samenzellen lagen im allgemeinen 1 1/2 Stunden, wobei eine postejakulatorische Alterungszeit von 3 Stunden nicht überschritten wurde (vgl. 3.2.2.4.). Eine 20-fache Verdünnung des Ejakulates mit Trispuffer, pH 7,2, garantierte eine optimale Verteilung der Lysiszonen auf den Gelatinemembranen mit bestmöglicher mikroskopischer Auswertbarkeit. Der Trispuffer setzte sich wie folgt zusammen:

6,056 g Tris-hydroxy-methyl-amino-methan,
3,40 g Zitronensäure,
2,50 g Fructose,
ad 168 ml Aqua dest.

Die pH-Einstellung des Puffers erfolgte mit 2 N NaOH bzw. Zitronensäure.

Die Testung verschiedener Akrosin-Inhibitoren erfolgte sowohl durch Direktzusatz der Hemmsubstanzen zum Ejakulat (vgl. 3.2.6.1.) als auch durch vorherige Sättigung der Gelatinemembranen mit Inhibitorlösung (vgl. 3.2.6.2.). Diese Hemmversuche wurden mit gewaschenen Spermatozoen durchgeführt. Auf diese Weise sollte ein eventuell störender Einfluß des Seminalplasmas auf die Hemmwirkung der Akrosininhibitoren vermieden werden.

Arbeitsgang bei Zusatz der Hemmsubstanzen zum Ejakulat:

- Verdünnen des Nativspermas auf ca. 50 Mill./ml mit Tris pH 7,2
- Waschen des verdünnten Ejakulats (je 0,2 ml) mit 5 ml Tris pH 7,2 (4 C, 600 g, 10 min.). Der Überstand wurde vollständig dekantiert. Alle Versuche wurden dreifach angesetzt.
- Resuspension des Sediments mit 0,2 ml $10^{-3}M$ bzw. $10^{-4}M$ Inhibitorlösung bzw. 0,2 ml Tris pH 7,2 als Kontrolle!

- Vorinkubation der Spermatozoen-Inhibitor-Suspension bei 37°C für 15 min.
- Waschen der Suspension mit 5 ml Tris, pH 7,2, bei 600 g für 10 min. zur Entfernung von nichtgebundenem Inhibitor.
- Auffüllen des Sediments mit Tris pH 7,2 auf 4 ml (= 20 x Verdünnung).
- Auftragen der Spermatozoensuspension auf Gelatinemembranen.

Das Verdünnen des Nativspermas auf ca. 50 Mill.Sp./ml garantierte ein nahezu konstantes Mengenverhältnis zwischen Anzahl der Spermatozoen und eingesetzter Inhibitorkonzentration. Eine Auswirkung unterschiedlicher Spermatozoendichten auf die Hemmintensität der Inhibitoren konnte damit eliminiert werden.

Die 20-fache Verdünnung des Sediments führte zu einer gut auswertbaren Verteilung der Spermatozoen auf den Gelatinemembranen.

Die Vorbehandlung des Ejakulates bei der Membransättigung mit Inhibitoren entsprach weitgehend dem Vorgehen bei Hemmstoffzusatz zum Sperma. Lediglich die Zugabe von 0,2 ml Inhibitorlösung zum Sediment wurde durch 0,2 ml Tris pH 7,2 ersetzt.

Arbeitsgang bei Membransättigung mit Inhibitoren:

- Verdünnen des Nativspermas auf ca. 50 Mill./ml
- Waschen des verdünnten Ejakulats (5 ml Tris pH 7,2, 600 g, 10 min.) und vollständiges Dekantieren des Überstandes.
- Resuspension des Sediments mit 0,2 ml Tris pH 7,2!
- Vorinkubation der Spermatozoen-Trispuffer-Suspension bei 37°C für 15 min.

- Waschen (5 ml Tris pH 7,2, 600 g, 10 min.)
- Verdünnen (20 x; Tris pH 7,2)
- Auftragen der Spermatozoensuspension auf die mit Inhibitoren gesättigten Gelatinemembranen!

Der nahezu identische Arbeitsgang im Vergleich zum Hemmstoffzusatz zum Sperma schloß methodisch bedingte Unterschiede beim Vergleich beider Inhibitionsansätze aus.

3.1.4.3. Inhibitoren

Es wurden die natürlicherweise vorkommenden Hemmstoffe Schweinspermaplasmainhibitor (SSPI), Trasylol, Leupeptin und die synthetischen Hemmstoffe 1-Chlor-3-tosylamid-7-amino-2-heptanon (TLCK) und p-Nitrophenyl-p-guanidinobenzoat (hydrochlorid) (NPGB) auf ihre Akrosinhemmwirkung hin untersucht (Tab. 1).

Tab. 1) Zusammenstellung der verwendeten Proteinase-Inhibitoren unter Berücksichtigung von Herkunft, Molekulargewicht, Einwaage und Endkonzentration (Molarität).

Hemmstoffe	Herkunft	Molekulargewicht	Einwaage	Molarität
SSPI	Prof. H. FRITZ ¹	10.000	5mg/0,5ml	10 ⁻³
Trasylol	Bayer Leverkusen Trasylol ^R -Trokensubstanz 500.000 KIE	6.500	6,5mg/1ml	10 ⁻³
Leupeptin	Prof. UMEZAWA ²	481	4,81mg/1ml	10 ⁻²
TLCK	Merk Art. 8163	369,31	3,69/1ml	10 ⁻²
NPGB	Merk Art. 10562	336,74	3,367/1ml	10 ⁻²

Die Versuche wurden mit einer Hemmstoffkonzentration von 10^{-3}M und 10^{-4}M durchgeführt. SSPI, Trasylol, Leupeptin und TLCK wurden in Trispuffer gelöst, wobei für die Ejakulat-Inhibitor-Suspension ein pH-Wert von 7,2 und für die Membransättigung ein pH-Wert von 8,2 verwendet wurde. Eine vollständige Lösung von NPGB in Trispuffer war dagegen nicht möglich. Dimethylformamid und Acetonitril mußten als Lösungsvermittler verwendet werden. Die Einwaage von 3,367 mg NPGB wurde mit 0,05 ml Dimethylformamid (0,05 M) und 0,2 ml Acetonitril (0,01 M) vorgelöst. Durch Erwärmen und langsame Zugabe von Trispuffer wurde schließlich die gewünschte Molarität der NPGB-Lösung eingestellt.

-
- 1 Es wird Herrn Prof. FRITZ und Mitarbeitern, Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie der Universität München für die Überlassung von SSPI zur Durchführung der Hemmversuche gedankt.
 - 2 Es wird Herrn Prof. UMEZAWA, Institute of Microbial Chemistry and Dept. of Antibiotics, National Institute of Health, Tokyo, Japan, für die Überlassung von Leupeptin zur Durchführung der Hemmversuche gedankt.

3.1.4.4. Gelatinebeschichtung der Objektträger

Kodak-AR-10 autoradiographic stripping plates dienten als Gelatinesubstrat für die Durchführung der Gelatinolyse. Diese Filmplatten sind mit einer Gelatineschicht und einer dünnen Filmemulsion überzogen.

Vorbehandlung der Filmplatten:

Zur Herstellung von gelatinebeschichteten Objektträgern

mußten die Kodak-Platten folgendermaßen vorbehandelt werden:

- Belichten der Filmplatten für 10 Minuten bei Tageslicht
- Entwicklung der Filmplatte im Kodak-D-19-Entwickler für 2 Sekunden
- Abspülen der Entwickler-Lösung mit Aqua dest. für 6 Sekunden
- Fixierung der Filmplatte in Kodak-Unifix für 60 Sekunden (Ansatz: 260 g ad 2,25 Liter Aqua dest.)
- Quellenlassen der Filmmembran in Aqua dest. bis zur vollständigen Faltenbildung und Ablösung der Membran von der Glasplatte
- Erneutes Aufziehen der gequollenen Membran auf die Glasplatte mit Umschlagen der Membranränder auf die Plattenunterseite
- Trockenlassen der Platten bei Raumtemperatur für 24 Stunden in vertikaler Stellung an staubgeschütztem Ort

Diese Behandlung der Kodak-Platten führte, dem Photoprozeß entsprechend, zu einer Einschwärzung der lichtempfindlichen Silberkörner der Filmschicht. Das Quellenlassen und erneute Aufziehen der Membran garantierte eine nahezu gleichmäßige Schichtdicke der Gelatine-Film-Emulsion über die gesamte Glasplatte.

Mit einem Skalpell wurden aus den getrockneten Gelatine-membranen 1x1 cm große Quatrare geschnitten, mit einer Pinzette von der Glasplatte abgelöst und so auf die Wasseroberfläche einer mit Aqua dest. gefüllten Wanne (Wassertemperatur 19 - 22°C) gelegt, daß die Film-Emulsions-schicht nach oben zeigte. Die Filmquatrare blieben 2 Minuten bis zum Aufquellen der Gelatineschicht im Wasserbad.

Anschließend wurden jeweils 3 Filmmembranen auf einen fett- und staubfreien Objektträger mittels einer Pinzette aufgezogen. Nach dem Abtrocknen der Membranen bei Zimmertemperatur in vertikaler Stellung konnten die Objektträger im Kühlschrank bis zum Gebrauch aufbewahrt werden.

Pro Kodak-Filmplatte entstanden auf diese Weise ca. 120 Membranquadrate, was etwa 40 beschichteten Objektträgern entspricht.

3.1.4.5. Applikation der Spermatozoen

Das für die jeweiligen Versuche vorbehandelte Ejakulat wurde mit Hilfe eines Glasstäbchens auf die gelatinebeschichteten Objektträger aufgerollt. Für die Korrelationsbestimmung zwischen photometrisch gemessener Akrosinaktivität und Gelatinolyse und für die Hemmversuche durch Zusatz der Inhibitoren zum Ejakulat mußten die Gelatinemembranen vor dem Aufbringen des Spermas für 1 Minute mit einer Trispufferlösung, pH 8,2, getränkt werden. Für die Versuche zur Membransättigung mit Inhibitoren wurden die Membranen für 1 Minute mit $10^{-3}M$ bzw. $10^{-4}M$ Pufferlösung, pH 8,2, benetzt. Nach dem Abtrocknen der Membranen in horizontaler Lage (15 Minuten Zimmertemperatur, 5 Minuten $37^{\circ}C$) wurden $10\mu l$ des jeweiligen Ejakulates auf einen Objektträger aufpipetiert und mit Hilfe eines Glasstabes ausgerollt. Die Spermatozoen, die auf den Gelatinemembranen zu liegen kamen, bewirkten durch Austritt von proteolytischem Enzym eine Gelatinolyse. Das Ausrollen des Ejakulates auf den Objektträgern mit Hilfe eines Glasstäbchens ergab eine nahezu gleichmäßige Verteilung der Spermatozoen.

3.1.4.6. Inkubation

Nach der Applikation der Spermatozoen auf die Gelatine-membranen wurden die Objektträger in einem speziellen Objektträgerbehälter in horizontaler Lage in einer feuchten Kammer (94% Luftfeuchtigkeit) bei 37°C inkubiert. Die Inkubationszeit von 30 Minuten erwies sich für die mikroskopische Auswertbarkeit der Lysiszonen bezüglich Größe und scharfer Begrenzung aufgrund von Vorversuchen als optimal (vgl. 3.2.2.5.). Der Depolymerisationsprozeß wurde nach dem Herausnehmen der Objektträger aus dem Reaktionsmilieu durch Lufttrocknung sofort gestoppt. Ein Fixieren oder Anfärben der Lysiszonen erwies sich als unnötig (vgl. 3.2.2.3.). Es ist von entscheidender Bedeutung, daß die äußeren Reaktionsbedingungen (37°C; 94% Luftfeuchtigkeit) konstant gehalten werden, da Enzymreaktionen besonders auf Temperaturschwankungen empfindlich reagieren.

3.1.4.7. Auswertung

Die Auswertung der proteolytischen Aktivität erfolgte mit einem Phasenkontrastmikroskop bei 500 x Vergrößerung. Der Durchmesser der kreisförmigen Halos wurde durch Messung zweier senkrecht stehender Durchmesser (Mittelwert) mit einem Okularmikrometer bestimmt (μm). Nach der Formel $F = r^2 \cdot \pi$ (μm^2) ließ sich daraus die Kreisfläche berechnen. Pro Gelatinemembran wurden 50 Spermatozohenalos ausgewertet, pro Objektträger 150. Der Mittelwert aus 150 Einzelbestimmungen ergab die durchschnittliche proteolytische Wirkung eines einzelnen Ejakulates. Ferner wurde der Prozentsatz der Spermatozoen bestimmt, die eine Halobildung

zeigten (lysisaktive Spermatozoen). Dazu wurden pro Membran 100, pro Objektträger 300 Spermatozoen ausgezählt und der Prozentsatz der lysisaktiven bzw. lysisinaktiven Spermatozoen angegeben.

3.1.4.8. Statistische Auswertung

Die statistische Analyse der Ergebnisse wurde nach SACHS (1972) durchgeführt. Für den Signifikanznachweis kam der verbundene und unverbundene Student-t-Test zur Anwendung. Signifikanzanalysen sowie die mathematischen Berechnungen von Mittelwerten, Standardabweichungen und mittleren Fehlern der Mittelwerte wurden mit dem Rechner HEWLETT PACKARD, Texas Inst. durchgeführt. Die Bestimmung von Regressionsgeraden und Korrelationskoeffizienten erfolgten mit einer OLIVETTI PROGRAMMA 101.

3.2. Ergebnisse

3.2.1. Vorversuche zur Gelatinolyse

3.2.1.1. Waschung der Spermatozoen

WENDT benutzte für die Darstellung der gelatinolytischen Aktivität von Bullenspermatozoen ungewaschene Samenzellen, da er im Gegensatz zu anderen Mitteilungen (GADDUM und BLANDAU, 1970; GADDUM-ROSSE und BLANDAU, 1972; BENITEZ-BRIBIESCA und VELAZQUEZ-MEZA, 1972; ALLEN et al., 1974) keine signifikanten Unterschiede zwischen gewaschenen und ungewaschenen Spermatozoen bezüglich ihres gelatinolytischen Potentials feststellen konnte (WENDT, 1974; WENDT et al., 1975a,c).

Der Einfluß des Waschvorgangs auf die gelatinolytische Aktivität von Humanspermatozoen wurde an Hand von 9 Ejakulaten (6 Normozoospermie, 3 Oligozoospermie) untersucht. Nach zweimaligem Waschen der Spermatozoen mit physiologischer Kochsalzlösung (600 g, 10 Minuten) wurden die gewaschenen und ungewaschenen Spermatozoen 30 Minuten lang auf Gelatinemembranen inkubiert.

Die Lysisflächen der ungewaschenen Spermatozoen waren in 7 von 9 Fällen zwischen 6,7 und 17,5 Prozent kleiner (Durchschnitt: 11,8 Prozent), in 2 Fällen bis 7,0 Prozent größer (Durchschnitt: 5,3 Prozent) als die entsprechenden Flächen gewaschener Spermatozoen (Tab. 2). Der abhängige t-Test zeigt eine Signifikanz $p < 0,0125$. Die Größe der Lysisfläche eines Ejakulates wurde als Mittelwert aus der Größe des Lysisdurchmessers 150 einzelner Spermatozoen ermittelt ($F = r^2 \pi$). Während die Einzelwerte der ungewaschenen Spermatozoen nur geringfügige individuelle Schwankungen im Bereich des mittleren Kreisdurchmessers zeigten, fanden sich bei den gewaschenen Spermatozoen teilweise erheblich größere Halodurchmesser im Vergleich zu der überwiegenden Zahl der im Normbereich liegenden Lysishöfe (Abb. 2). Aufgrund der größeren Abweichungen einzelner lysisaktiver Spermatozoen resultierten schließlich die signifikant höheren Durchschnittswerte für die Lysisflächen gewaschener Spermatozoen.

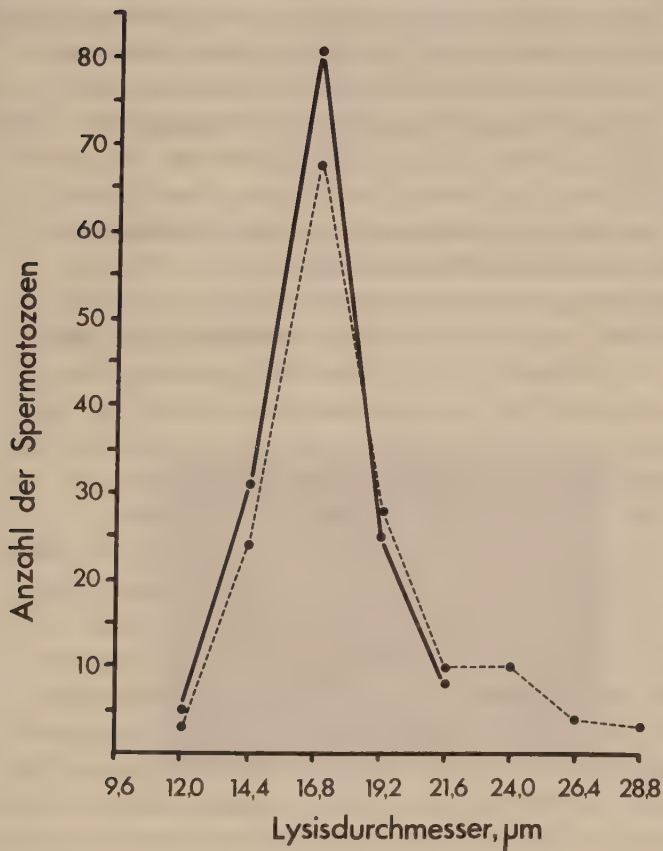
In Anbetracht dieser Ergebnisse wurden die Versuche über das Korrelationsverhalten zwischen der photometrisch bestimmten Akrosinaktivität und der Lysisfläche ausschließlich mit ungewaschenen Spermatozoen durchgeführt.

Tab. 2: Einfluß des Waschvorgangs auf die gelatinolytische Aktivität von Humanspermatozoen. Die Lysisflächen der ungewaschenen Ejakulate stellen die Bezugs-
werte für die Berechnung von Differenz und Prozentabweichung dar.

Humansperma	Lysisfläche (μm^2)		Differenz	Prozentabweichung
	gewaschene Sp.	ungewaschene Sp.		
Normozoosp.	335,4	308,2	+27,2	+ 8,8%
"	236,7	201,5	+35,2	+17,5%
"	279,3	289,8	-10,5	-13,6%
"	321,2	285,0	+36,2	+12,7%
"	337,9	315,6	+22,3	+ 7,1%
"	257,0	221,5	+35,5	+16,0%
Oligozoosp.	325,3	286,5	+38,8	+13,5%
"	248,0	266,7	-18,7	- 7,0%
"	198,0	185,5	+12,5	+ 6,7%
Mittelwert	282,1	262,3	+19,8	+ 6,9%
Std. Abw.	50,4	47,5		
Std.F.d.M.	16,8	15,9		

Abb. 2: Verteilung der gelatinolytischen Aktivität gewaschener und ungewaschener Spermatozoen am Beispiel eines Ejakulates aus der Gruppe der Normozoospermie.

- ungewaschene Spermatozoen: $221,5 \mu\text{m}^2$
- - -•- gewaschene Spermatozoen: $257,0 \mu\text{m}^2$



3.2.1.2. Puffer- und Inkubationslösungen

Die Eignung von Trispuffer als Inkubations- und Waschmedium für Spermatozoen ließ die Frage entstehen, inwieweit physiologische Kochsalzlösung und Bakerlösung (SCHIRREN, 1971) das gelatinolytische Verhalten der Spermatozoen beeinflussen könnte.

Die Versuche wurden mit ungewaschenen Spermatozoen aus drei verschiedenen Normozoospermie-Ejakulaten durchgeführt. Die Benetzung der Gelatinemembranen vor Applikation der Spermatozoen und die Verdünnung der Ejakulate erfolgte mit Bakerlösung (pH 7,2), physiologischer Kochsalzlösung (pH 6,8) und Trispuffer (pH 8,2). Lediglich der Trispuffer wurde für die Ejakulatverdünnung auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt. Die Durchführung der Versuche entsprach dem Arbeitsgang unter Standardbedingungen.

Die Auswertung der Lysiszonen der Spermatozoen ergab bei den verschiedenen Inkubationslösungen beträchtliche Unterschiede. Die mit Trispuffer erzielten Halos waren rund und scharf begrenzt, die Rate der lysisaktiven Zellen lag bei 70 - 90 Prozent. Die Gelatinemembranen zeigten unmittelbar nach der Inkubation sowie nach längerem Aufbewahren der Objektträger keine auffälligen Strukturveränderungen.

Unter dem Einfluß von Bakerlösung stellten sich nach der üblichen Inkubation scharf begrenzte Lysiskreise dar, deren mittlerer Durchmesser um ca. 10 Prozent kleiner war als der vergleichbare Wert bei Verwendung von Trispuffer. Nach einer ca. 3-stündigen Aufbewahrung der Objektträger bei Zimmertemperatur bildeten sich mikroskopisch sichtbare bläschenartige Verwerfungen auf den Gelatinemembranen. Die zunächst scharf begrenzten Lysiszonen begannen zu schrumpfen, so daß eine spätere Messung der Lysisflächen unmöglich wurde.

Die Beeinflussung der Gelatinolyse in Anwesenheit von physiologischer Kochsalzlösung ergab um 30 - 50 Prozent kleinere Lysishöfe und im Vergleich zum Trispuffer eine deutlich erniedrigte Anzahl lysisaktiver Zellen (40 - 50 Prozent lysisaktive Zellen). Schließlich führte auch Kochsalzlösung mit zunehmender Aufbewahrungsdauer der Objektträger zu Veränderungen an den Gelatinemembranen (Kristallbildung).

Bakerlösung und physiologische Kochsalzlösung zeigten für die gelatinolytische Methode im Vergleich mit Trispuffer keinen Vorteil. Für die Durchführung der Versuche zur Gelatinolyse wurde daher der Trispuffer beibehalten.

Abb. 3: Gelatineproteolyse von menschlichen Spermatozoen nach 30 minütiger Inkubationszeit. Als Verdünnungs- und Inkubationsmedium wurde Bakerlösung, pH 7,2, verwendet.
Vergrößerung: 500 fach

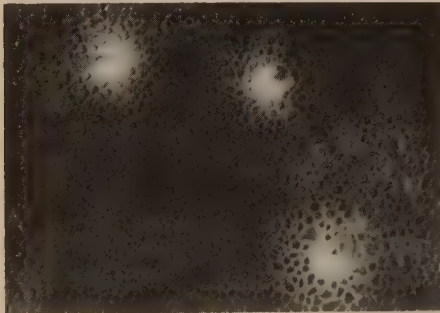


Abb. 4: Gelatineproteolyse von menschlichen Spermatozoen nach 30 minütiger Inkubationszeit. Als Verdünnungs- und Inkubationsmedium wurde physiologische Kochsalzlösung, pH 6,8, verwendet.
Vergrößerung: 500 fach

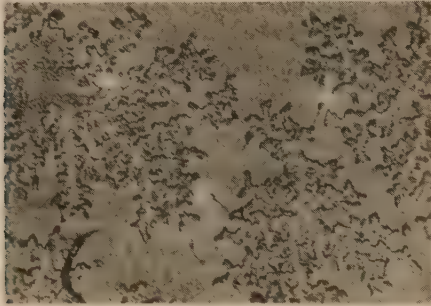
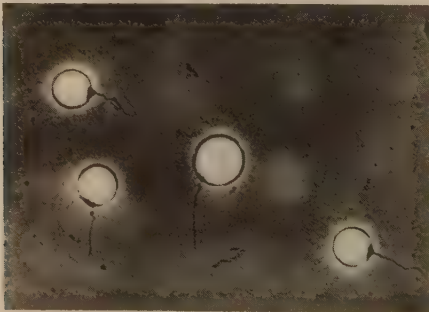


Abb. 5: Gelatineproteolyse von menschlichen Spermatozoen nach 30 minütiger Inkubationszeit. Als Verdünnungs- und Inkubationsmedium wurde Trispuffer, pH 7,2 bzw. pH 8,2, verwendet.
Vergrößerung: 500 fach



3.2.1.3. Stabilität der Lysiszonen

Die beschriebenen Methoden zur Bestimmung der gelatinolytischen Aktivität proteolytischer Enzyme sahen keine Fixierung der Gelatinemembranen nach dem Inkubationsprozeß vor. Es wurde deshalb geprüft, ob die Lysisflächen der Spermatozoen nach Beendigung der Inkubation sich weiter verändern bzw. ob die Lysiskreise unter Raumbedingungen konstant bleiben.

Die Testung erfolgte mit mehreren Ejakulaten der Gruppe Normozoospermie und Oligozoospermie. Der Versuchsablauf entsprach Standardbedingungen. Unmittelbar nach Beendigung der Inkubation eines Ejakulates wurde unter dem Phasenkontrastmikroskop ein Gesichtsfeld mit mehreren Halobildungen eingestellt und der Durchmesser dieser Lysiszonen zur Zeit 0, 15 min., 30 min., 60 min. und 300 min. nach Inkubationsende bestimmt.

Es konnten keine Größenveränderungen der Halodurchmesser über den Beobachtungszeitraum von 5 Stunden festgestellt werden. Damit erwiesen sich zusätzliche Maßnahmen zur Beendigung der Lysisreaktion und zur Stabilisierung der Lysiszonen (z.B. Fixierung) als unnötig.

3.2.1.4. Ejakulatalterung

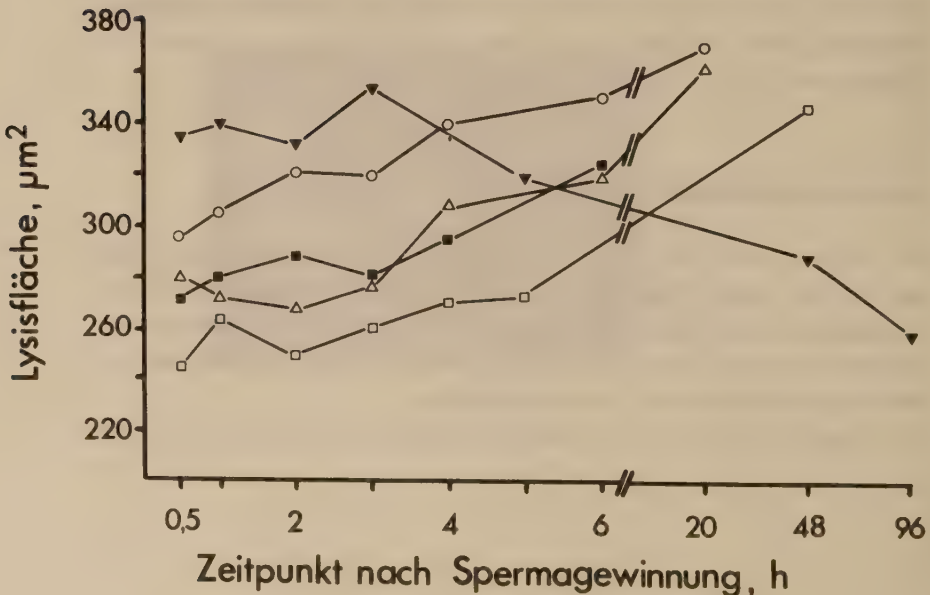
Da es aus technischen Gründen nicht möglich war, die Lysisaktivität aller Ejakulate unmittelbar nach deren Verflüssigung zu bestimmen, war es erforderlich, den Einfluß der Alterung eines Ejakulates auf die gelatinolytische Aktivität der Spermatozoen zu untersuchen.

Um dies durchzuführen wurde die gelationolytische Aktivität

der Spermatozoen von 5 Ejakulaten der Gruppe Normozoospermie, Oligozoospermie und Asthenozoospermie in Abhängigkeit von der postejakulatorischen Spermaalterung bestimmt. Der Versuchsablauf entsprach Standardbedingungen. Abbildung 6 zeigt, daß innerhalb von 3 Stunden post ejaculationem eine über die methodisch bedingten Schwankungen hinausgehende Änderung des gelatinolytischen Verhaltens nicht zu erwarten ist. Eine Ejakulatalterung von mehr als 4 Stunden ließ in 4 von 5 Fällen einen deutlichen Anstieg der Lysisflächen erkennen.

Abb. 6: Verhalten der gelatinolytischen Aktivität der Spermatozoen in Abhängigkeit vom postejakulatorischen Alterungsprozeß.

Diagnose:	Spermatozoendichte:
Asthenozoospermie;	97 Mill/ml;
Asthenozoospermie;	56 Mill/ml;
Normozoospermie;	75 Mill/ml;
Normozoospermie;	56 Mill/ml;
Oligozoospermie;	28 Mill/ml;



3.2.1.5. Kinetik der Gelatinolyse

Die Ausbildung der Lysiszonen auf den Gelatinemembranen wurde in Abhängigkeit von der Inkubationszeit untersucht. Die Versuchsdurchführung erfolgte mit ungewaschenen Spermatozoen unter Standardbedingungen. Die Inkubationszeiten lagen zwischen 1 Minute und 16 Stunden.

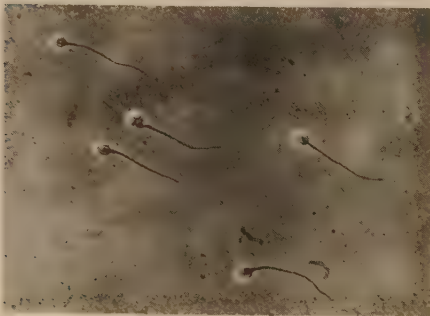
Binnen 2-3 Minuten nach Auftragen und Inkubation der Spermatozoen konnte unter dem Phasenkontrastmikroskop der Beginn der Lysisreaktion festgestellt werden. Innerhalb der dunkelbraunen Eigenfarbe der Gelatinemembranen wurden streifenförmige Aufhellungen entlang der gesamten Kopfkappe sichtbar. Mit zunehmender Inkubationszeit vergrößerte sich die Depolymerisationszone konzentrisch um das Akrosom. Schließlich wurde der Spermatozookopf in die Lysiszone mit eingeschlossen, teilweise lagen auch Mittelstück und vordere Schwanzanteile des Spermatozoons innerhalb der Lysiszone. Das Maximum der Lysishöfe war nach 2 Stunden erreicht. Längere Inkubationszeiten führten zu einer kontinuierlichen Verkleinerung der Lysisflächen mit zunehmender Unschärfe und Entrundung der Depolymerisationszonen. Die Standardinkubationszeit von 30 Minuten wurde gewählt, weil sie hinsichtlich Größe und Kontrastierung der Lysiszonen eine optimale mikroskopische Auswertbarkeit gewährleistete. (Tab. 3; Abb. 7a-d; Abb. 8).

Tab. 3: Verhalten der mittleren Lysisfläche (μm^2) menschlicher Spermatozoen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

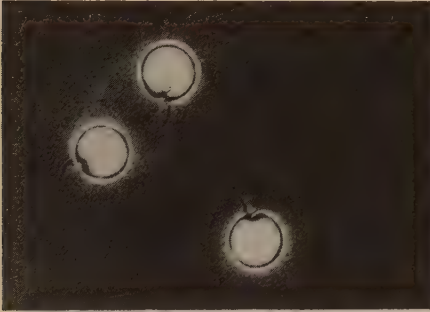
Human-sperma	2min.	7min.	15min.	30min.	1Std.	2Std.	3Std.	4Std.	6Std.	16Std.
Normo- zoosp. Lysis	ini- tiale	50	100	304	390	678	600	422	203 (μm^2)	Membran zerstört
Asthe- nozoc.				265	324	456		290	190 (μm^2)	Membran zerstört
Oligo- zoosp. Lysis	ini- tiale			263	303	353	306	243	160 (μm^2)	Membran zerstört
Oligo- zoosp.				160	225	304		205	100 (μm^2)	

Abb. 7: Die Gelatineproteolyse menschlicher Spermatozoen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.
Vergrößerung: 500-fach,

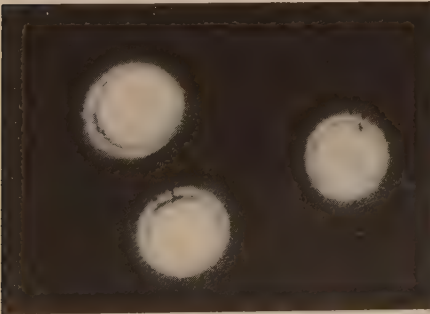
- a) 2 Minuten nach Applikation der Spermatozoen auf den Gelatinemembranen beginnt die Lysisreaktion entlang der gesamten Kopfkappe.



- b) Eine Inkubationszeit von 30 Minuten gewährleistet hinsichtlich Größe und Kontrastierung der Lysiszonen eine optimale mikroskopische Auswertbarkeit.



- c) Die maximale Größe der Depolymerisationszonen ist nach 2 Stunden erreicht.



- d) Lange Inkubationszeiten (z.B. 16 Stunden) bewirken eine diffuse Proteolyse der Gelatinemembranen. Eine quantitative Auswertung der Halos ist nicht mehr möglich.

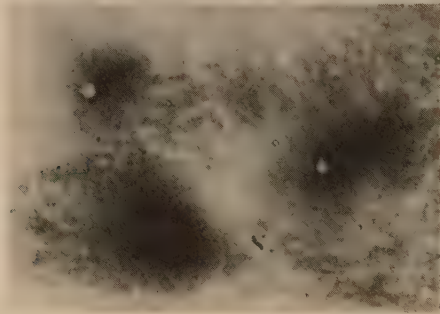
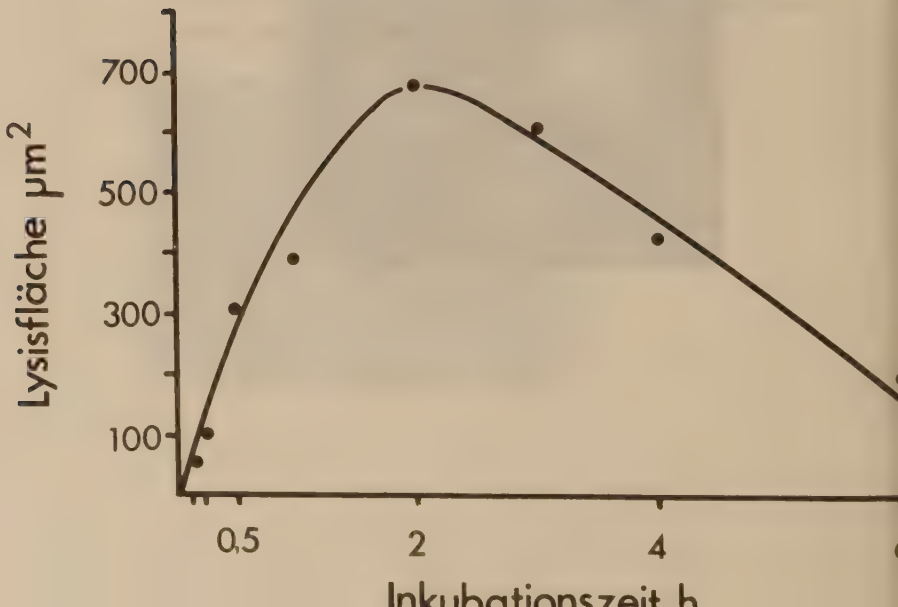


Abb. 8: Graphische Darstellung der mittleren Lysisfläche menschlicher Spermatozoen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit am Beispiel eines Ejakulates der Gruppe Normozoospermie (vgl. Tab. 3).



3.2.1.6. Einfluß von Spermaplasmaproteasen

Wie unter dem Abschnitt 3.2.2.5. dargestellt, führte eine Inkubationszeit von mehr als 2 Stunden bei Verwendung ungewaschener Spermatozoen zu einer kontinuierlichen Verkleinerung der Lysishöfe. In diesem Zusammenhang war es von Interesse, inwieweit eine Beeinflussung der Gelatinolyse durch proteolytische Enzyme des Spermaplasmas berücksichtigt werden mußte.

Um diese Frage abzuklären wurde ein Ejakulat in 3 Fraktionen unterteilt, so daß eine unbehandelte Fraktion, eine spermaplasmafreie Spermatozoensuspension (zweimaliges Waschen bei 600 g für 10 min.; 4°C) und eine spermatozoenfreie Seminalplasmafraktion (1200 g; 10 min.; 4°C) entstanden. Alle 3 Ansätze wurden jeweils 30 Minuten und 16 Stunden auf Gelatinemembranen inkubiert (Tab. 4).

Tab. 4: Einfluß verschiedener Spermakomponenten auf Gelatinolyse und Morphologie der Gelatinemembranen nach kurzer und langer Inkubationszeit.

Ansatz	Inkubationszeit	
	30 Minuten	16 Stunden
unbehandeltes Ejakulat (Spermat. + Seminalpl.+Puffer)	285 μm^2 ; Membran unverändert; Lysishöfe scharf begrenzt	Membran verändert (Andauung); Lysishöfe nicht auswertbar
spermaplasmafreie Spermatozoen + Puffer	321 μm^2 ; Membran unverändert; Lysishöfe scharf begrenzt	650 μm^2 ; Membran unverändert; Lysishöfe auswertbar, aber unscharfe Ränder
spermatozoenfreies Seminalplasma + Puffer	Membran unverändert; keine Lysisbildung	Membran verändert (Andauung); keine Lysisbildung
Puffer	Membran unverändert; keine Lysisbildung	Membran unverändert; keine Lysisbildung

Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten konnte zwischen unbehandelten (Nativsperma) und gewaschenen Spermatozoen des untersuchten Ejakulates eine Größendifferenz der Lysisflächen von 12,6 Prozent festgestellt werden (vgl. 3.2.1.1.) Seminalplasma allein ließ nach 30 Minuten keine Proteolyse der Gelatinemembranen erkennen. Erwartungsgemäß verhielt sich auch der Puffer lysisinaktiv. Nach einer Inkubationsdauer von 16 Stunden kam es bei unbehandeltem Ejakulat und spermatozoenfreiem Seminalplasma durch Andauung zu einer Auflösung der Membranstruktur im Sinne eines unregelmäßigen "Zerfließens der Gelatine". Die Lysiskreise waren nicht mehr auswertbar. Hingegen verursachten gewaschene Spermatozoen nach 16 stündiger Inkubation keine Gelatine- bzw. Membranveränderung. Die durch die Spermatozoen verursachten Lysiskreise nahmen an Größe zu, die quantitative Auswertung wurde allerdings durch unscharfe Randzonen der Halos und Entrundung der Lysiszonen erschwert. Trispuffer zeigte auch bei langer Inkubationszeit keinen Einfluß auf die Membranbeschaffenheit (Abb. 9-11).

Abb. 9: Gelatineproteolyse durch Spermatozoen eines unbehandelten Ejakulates (Nativsperma) nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten.



Abb. 10: Gelatineproteolyse durch Spermatozoen eines unbehandelten Ejakulates (Nativsperma) nach einer Inkubationszeit von 16 Stunden.

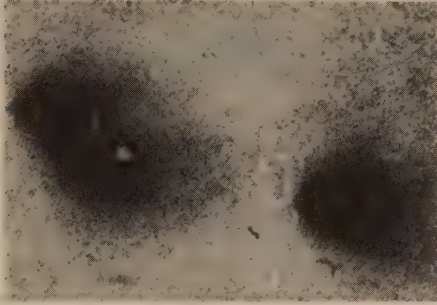
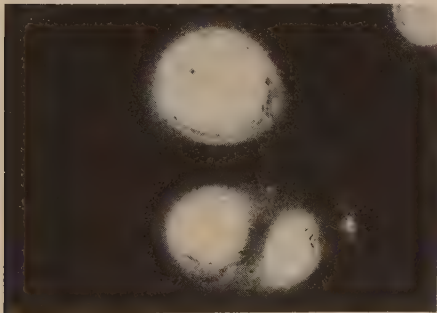


Abb. 11: Gelatineproteolyse durch gewaschene Spermatozoen nach einer Inkubationszeit von 16 Stunden.



3.2.1.7. Fehlerbreite der Gelatinolyse

Die Ermittlung der Fehlerbreite der Methode der Gelatinolyse erfolgte mit Hilfe von 2 Ejakulaten der Gruppe Normozoospermie und Oligozoospermie. Es wurde die durchschnittliche Lysisfläche der Spermatozoen der betreffenden Ejakulate auf 10 verschiedenen Membranträgern bestimmt. Der Versuchsablauf entsprach Standardbedingungen (Tab. 5).

Tab. 5: Methodischer Fehler der Lysisbestimmung eines Ejakulates an Hand von 10 unabhängigen Versuchsansätzen.

Versuchs- ansatz	Normozoospermie		Oligozoospermie	
	Fläche(μm^2)	Mittelw. Diff.(μm^2)	Fläche(μm^2)	Mittelw. Diff.(μm^2)
1	286,4	- 2,0	237,8	- 4,9
2	249,7	-38,7	201,2	-41,7
3	277,3	-11,1	213,9	-29,0
4	308,0	+19,6	266,3	+23,4
5	284,2	- 3,8	242,5	- 0,4
6	325,0	+36,6	278,6	+35,7
7	292,2	+ 3,8	215,0	-27,9
8	281,4	- 7,0	235,3	- 7,6
9	258,1	-30,3	281,1	+38,2
10	321,3	+32,9	257,0	+14,1
Mittelw. (μm^2)	288,4		242,9	
SD	24,6		27,7	
SE	7,8		8,8	

Der Variationskoeffizient für die Bestimmung der mittleren Haloflächen betrug für die Normozoospermie $\pm 8,5$ Prozent, für die Oligozoospermie $\pm 11,4$ Prozent.

3.2.2. Photometrische Bestimmung der Akrosinaktivität

3.2.2.1. Korrelation zwischen Akrosinaktivität und Spermatozoendichte

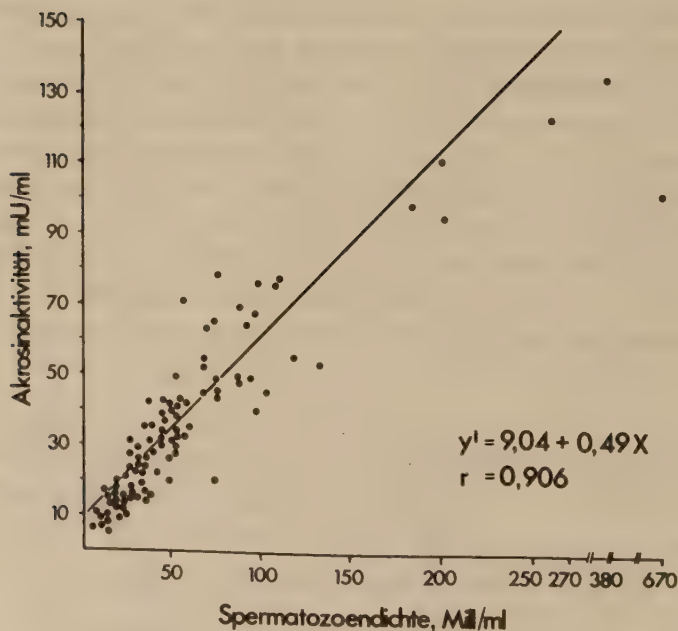
SCHILL(1974) untersuchte bei der Bestimmung der Akrosinaktivität menschlicher Spermatozoen 240 Ejakulate, wovon 105 Ejakulate auf die Gruppe Normozoospermie, 102 auf die Gruppe Oligozoospermie und 33 auf die Gruppe Asthenozoospermie entfielen. Die mittlere Spermatozoendichte betrug dabei 58,2 Mill/ml (SD $\pm$ 46,2 Mill/ml), die mittlere Akrosinaktivität 43,3 mU/ml (SD $\pm$ 35,1 mU/ml). Zwischen der Spermatozoendichte (Mill/ml) und der Akrosinaktivität (mU/ml) bestand eine strenge Korrelation (Korrelationskoeffizient $r = 0,812$)

Eigene Untersuchungen zur Darstellung des Korrelationsverhaltens zwischen extrahierbarer Akrosinaktivität und vorgegebener Spermatozoendichte umfaßten insgesamt 97 Ejakulate, wobei 28 der Gruppe Normozoospermie, 45 der Gruppe Oligozoospermie, 22 der Gruppe Asthenozoospermie und 2 der Gruppe Polyzoospermie angehörten. Es zeigte sich eine mittlere Spermatozoendichte von 63,7 Mill/ml (SD $\pm$ 82,7 Mill/ml) und eine mittlere Akrosinaktivität von 37,4 mU/ml (SD $\pm$ 26,3 mU/ml). Der Korrelationskoeffizient des Gesamtkollektivs ($n = 97$) betrug $r = 0,759$. Ein Vergleich der einzelnen Ejakulatgruppen ergab für die Gruppe der Normozoospermie das beste Korrelationsverhalten ($r = 0,905$); Tab. 6; Abb. 15).

Tab.:6: Korrelation zwischen der photometrisch bestimmten Akrosinaktivität (mU/ml) und der Spermatozoendichte (Mill/ml) bei Ejakulaten der Gruppe Normozoospermie, Asthenozoospermie und Oligozoospermie.
 r = Korrelationskoeffizient
 T = Testgröße zur Prüfung der Nullhypothese $r \neq 0$
 F = Freiheitsgrad

	Gesamtkoll. (n=97)	Normozoosp. (n=28)	Asthenozoosp. (n=22)	Oligozoosp. (n=45)
r	0,759	0,905	0,788	0,732
T	11,370	10,840	5,723	7,042
F	95	26	20	43

Abb. 12: Graphische Darstellung der Korrelation zwischen der photometrisch bestimmten Akrosinaktivität (mU/ml) und der Spermatozoendichte (Mill/ml) an Hand von 95 Ejakulaten. Korrelationskoeffizient: $r = 0,906$
Regressionsgerade: $y = 9,04 + 0,49x$;
Unter Berücksichtigung der Meßwerte von 2 Ejakulaten der Gruppe Polyzoospermie ($n = 97$) beträgt der Korrelationskoeffizient $r = 0,759$.



3.2.2.2. Statistische Auswertung

Die Akrosinaktivität pro 1 ml Ejakulat (mU/ml) kann durch einfachen Rechenschritt auf 10^6 Spermatozoen umgerechnet werden ($\text{mU}/10^6 \text{ Sp}$). Tab. 7 gibt einen Überblick der Akrosinaktivitäten ($\text{mU}/10^6 \text{ Sp}$) innerhalb einzelner Ejakulatgruppen.

Tab. 7: Akrosinaktivitäten ($\text{mU}/10^6 \text{ Sp}$) von Ejakulaten der Gruppe Normozoospermie, Asthenozoospermie, Oligozoospermie und Polyzoospermie.

	Gesamt- koll:A	Normo- zoosp:B	Asthen- zoosp:C	Oligo- zoosp:D	Poly- zoosp:E
Anzahl d. Proben (n)	97	28	22	45	2
Mittelw. ($\text{mU}/10^6 \text{ Sp}$)	0,71	0,69	0,65	0,77	0,25
SD	0,22	0,17	0,20	0,23	0,14
SE	0,02	0,03	0,04	0,03	0,1

Es zeigte sich eine mäßige Zunahme des Mittelwertes der Akrosinaktivität bei abnehmender Spermatozoendichte (Normozoospermie: $0,69 \text{ mU}/10^6 \text{ Sp}$. - Oligozoospermie: $0,77 \text{ mU}/10^6 \text{ Sp}$.). Ein umgekehrtes Verhalten ergab der Vergleich Normozoospermie zu Polyzoospermie. Die geringe Fallzahl der Polyzoospermiegruppe ($n = 2$) ließ jedoch keine allgemeingültigen Schlüsse zu.

Die Frage nach signifikanten Unterschieden zwischen den einzelnen Ejakulatgruppen aufgrund ihrer Akrosinaktivitäten wurde mit dem unverbundenen Student-t-Test geprüft (Tab. 8).

Tab. 8: Signifikanzverhalten verschiedener Ejakulatgruppen aufgrund ihrer Akrosinaktivitäten. (Gruppeneinteilung vgl. Tab. 7).

	B/D	B/C
t	-1,5919	0,8027
p	>0,05	>0,20

Der Vergleich Normozoospermie (B) zu Oligozoospermie (D) und Normozoospermie (B) zu Asthenozoospermie (C) erbrachte keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$; $p > 0,20$).

Für eine genauere Analyse des Verhaltens der Akrosinaktivität innerhalb der Gruppen Normozoospermie und Oligozoospermie wurden die Ejakulate mit Normozoospermie in 3 Subgruppen unterteilt (40-80 Mill/ml; 80-120 Mill/ml und 120-250 Mill/ml). Die Aufteilung der Ejakulate mit Oligozoospermie erfolgte ebenfalls in 3 Untergruppen (20-40 Mill/ml; 10-20 Mill/ml; <10 Mill/ml).

Ein Vergleich der Mittelwerte der Akrosinaktivitäten innerhalb der einzelnen Normozoospermie- und Oligozoospermieuntergruppen bestätigte die Tendenz einer Zunahme der Akrosinaktivität bei abnehmender Spermatozoendichte und umgekehrt. (Tab. 9)

Tab. 9: Akrosinaktivitäten ($\text{mU}/10^6\text{Sp}$) von Normozoospermie- und Oligozoospermieuntergruppen.

	<u>Normozoospermie</u>			<u>Oligozoospermie</u>		
	40 - 80 Mill/ml F	80-120 Mill/ml G	120-250 Mill/ml H	20 - 40 Mill/ml I	10 - 20 Mill/ml J	<10 Mill/ml K
Anzahl d. Proben	20	5	3	30	12	3
Mittelw. ($\text{mU}/10^6\text{Sp}$)	0,74	0,60	0,52	0,72	0,84	0,95
SD	0,16	0,14	0,04	0,22	0,24	0,25
SE	0,04	0,06	0,02	0,04	0,07	0,14

Die statistische Analyse der Normozoospermieuntergruppen (Tab. 10) ergab signifikante Unterschiede der Gruppe 40-80 Mill/ml (F) zu den Gruppen 80-120 Mill/ml (G; $p < 0,05$) und 120-250 Mill/ml (H; $p < 0,025$). Zwischen der Gruppe 80-120 Mill/ml (G) und 120-250 Mill/ml (H) bestand kein signifikanter Unterschied ($p > 0,15$).

Der statistische Vergleich der Akrosinaktivitäten zwischen den Oligozoospermieuntergruppen und dem Mittelwert der Normozoospermieejakulate zeigte signifikante Unterschiede zwischen Normozoospermie (B) und den Gruppen 10-20 Mill/ml (J; $p < 0,025$) und <10 Mill/ml (K; $p < 0,01$). Zwischen den Ejakulaten mit Normozoospermie (B) und der Gruppe 20-40 Mill/ml (I) konnte keine signifikante Abweichung festgestellt werden ($p > 0,25$).

Tab. 10: Signifikanzverhalten von Normozoospermie- und Oligozoospermieuntergruppen aufgrund ihrer Akrosinaktivitäten. Gruppeneinteilung vgl. Tab. 7 und Tab. 9).

	<u>Normozoospermie</u>				<u>Oligozoospermie</u>		
	F/G	F/H	F/G+H	G/H	B/I	B/J	B/K
t	1,8448	2,3808	2,7910	0,9106	-0,6746	-2,2523	-2,4629
p	<0,05*	<0,025*	<0,01*	>0,15	>0,25	<0,025*	<0,01*

3.2.3. Gelatinolytische Aktivität der Spermatozoen

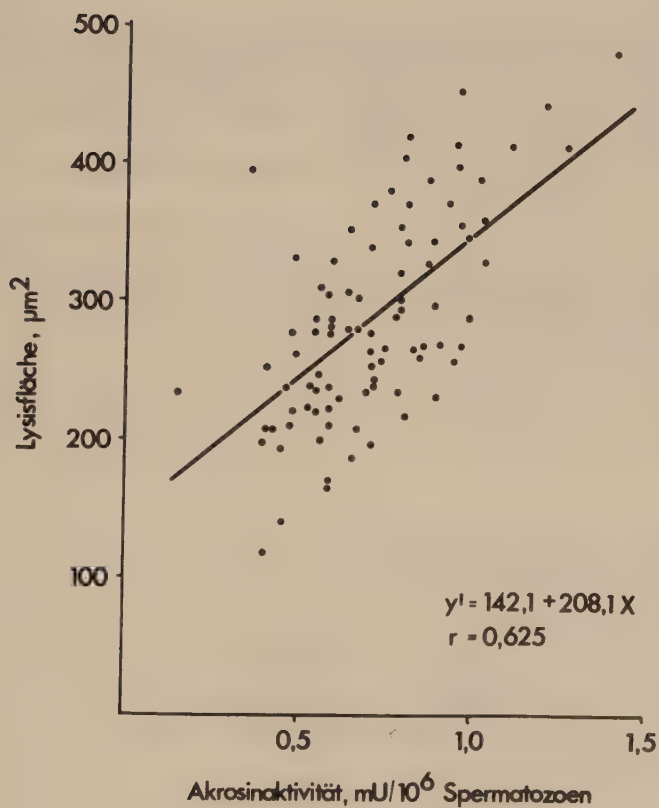
3.2.3.1. Korrelation zwischen Akrosinaktivität und Lysisfläche

Um die gelatinolytische Wirkung menschlicher Spermatozoen auf die enzymatische Aktivität des Akrosins zurückführen zu können, mußte der Nachweis einer Korrelation zwischen der Lysisfläche und der photometrisch gemessenen Enzymaktivität erbracht werden (Abb. 13).

Abb. 13: Graphische Darstellung der Korrelation zwischen der Akrosinaktivität ($\text{mU}/10^6\text{Sp}$) und der mittleren Lysisfläche (μm^2) bei 97 Ejakulaten.

Korrelationskoeffizient: $r = 0,625$;

Regressionsgerade: $y = 142,1 + 208,1x$



Lysisfläche und Akrosinaktivität ergaben für das Gesamtkollektiv von 97 Ejakulaten einen Korrelationskoeffizienten von $r = 0,625$. Für die Gruppe der Normozoospermie wurde ein Korrelationskoeffizient von $r = 0,702$ ermittelt, für die Gruppe der Oligozoospermie betrug dieser Wert $r = 0,521$. Eine Übersicht über das Korrelationsverhalten der einzelnen Ejakulatgruppen stellt Tab. 11 dar.

Tab. 11: Korrelation zwischen der Akrosinaktivität ($\text{mU}/10^6\text{Sp}$) und der Lysisfläche (μm^2) bei Ejakulaten der Gruppe Normozoospermie, Asthenozoospermie und Oligozoospermie.
 r = Korrelationskoeffizient
 T = Testgröße zur Prüfung der Nullhypothese $r = 0$
 F = Freiheitsgrad

	Gesamtkoll. (n=97)	Normozoosp. (n=28)	Asthenozoosp. (n=22)	Oligozoosp. (n=45)
r	0,625	0,702	0,652	0,521
T	7,795	3,109	3,848	6,457
F	95	26	20	43

3.2.3.2. Statistische Auswertung

Es galt zu prüfen, inwieweit ein Zusammenhang zwischen der Größe der Lysisfläche individueller Ejakulate und deren Zugehörigkeit zu bestimmten Ejakulatgruppen bestand.

Tab. 12 gibt eine Übersicht der Lysisflächen unterschiedlicher Ejakulatgruppen.

Tab. 12: Verhalten der Lysisflächen von Normozoospermie, Asthenozoospermie, Oligozoospermie und Polyzoo-
spermie.

	Gesamt- koll: A	Normo- zoosp:B	Asthen- zoosp: C	Oligo- zoosp:D	Poly- zoosp:E
Anzahl d. Proben(n)	97	28	22	45	2
Mittelw. (μm^2)	289,6	275,2	274,8	305,0	309,2
SD	72,9	63,8	62,3	80,3	105,0
SE	7,4	12,1	13,3	12,0	74,3

Der Vergleich Normozoospermie zu Oligozoospermie führte bei abnehmender Spermatozoendichte bzw. zunehmender Akrosinak-
tivität (vgl. Tab. 7) zu einem Anstieg des Lysisflächenmit-
telwertes. Die Zunahme der Lysisflächen von 2 Ejakulaten mit
Polyzoospermie zeigte hierbei kein sinngemäßes Verhalten.
Die statistische Analyse im Hinblick auf signifikante Unter-
schiede zwischen den einzelnen Ejakulatgruppen aufgrund
ihrer Lysisflächen zeigt Tab. 13.

Tab. 13: Signifikanznachweis verschiedener Ejakulatgruppen
aufgrund von Lysisflächen.(Gruppeneinteilung vgl.
Tab. 12).

	B/C	B/D
t	0,0267	-1,6607
p	>0,4875	>0,05

Der Vergleich Normozoospermie (B) zu Asthenozoospermie (C) und Normozoospermie (B) zu Oligozoospermie (D) erbrachte keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,4875$; $p > 0,05$).

Tab. 14 stellt das Verhalten der Lysisflächen innerhalb einzelner Ejakulatuntergruppen dar. Auch hier bestätigte sich das Prinzip: eine Abnahme der Spermatozoendichte führt zu einer Zunahme der Akrosinaktivität und damit zu einem Anstieg der Lysisflächen.

Tab. 14: Verhalten der Lysisflächen von Normozoospermie- und Oligozoospermieuntergruppen.

	<u>Normozoospermie</u>			<u>Oligozoospermie</u>		
	40 - 80	80-120	120-250	20 - 40	10-- 20	10
	Mill/ml F	Mill/ml G	Mill/ml H	Mill/ml I	Mill/ml J	Mill/ml K
Anzahl d. Proben(n)	20	5	3	30	12	3
Mittelw. (μm^2)	279,2	271,8	254,6	292,9	329,4	328,9
SD	70,6	56,1	20,5	77,0	84,4	100,7
SE	15,8	25,1	11,8	14,1	24,4	58,2

Tab. 15 gibt einen Überblick der Signifikanzanalyse zwischen einzelnen Ejakulatgruppen aufgrund ihrer Lysisflächen.

Tab. 15: Signifikanzverhalten von Normozoospermie- und Oligozoospermieuntergruppen. ((Gruppeneinteilung vgl. Tab. 12 und Tab. 14).

	<u>Normozoospermie</u>				<u>Oligozoospermie</u>			
	F/G	F/H	F/G+H	G/H	B/I	B/J	B/K	B/J+K
t	0,2170	0,5880	0,5118	0,4967	-0,9453	-2,2313	-1,3183	-2,3697
p	>0,40	>0,25	>0,30	>0,30	>0,15	<0,025*	<0,05*	<0,025*

Die Bestimmung der Lysisflächen bedeutete für die Untergruppen der Normozoospermie (F;G;H) im Gegensatz zur photometrischen Akrosinaktivitätsmessung keine signifikanten Unterschiede (vgl. Tab. 10).

Ein Vergleich der Lysisflächen von Ejakulaten mit Normozoospermie (B) und Oligozoospermieuntergruppen ließ signifikante Abweichungen für die Gruppen unter 20 Mill/ml (J;K) erkennen ($p < 0,025$). Zwischen dem Normozoospermiekollektiv (B) und der Gruppe 20-40 Mill/ml (I) bestand keine Signifikanz ($p > 0,15$). Diese Ergebnisse stimmten mit der Signifikanzanalyse der photometrisch bestimmten Akrosinaktivitäten überein.

3.2.4. Beziehungen zwischen lysisinaktiven Spermatozoen und Spermatozoenmorphologie

Aufgrund theoretischer Überlegungen ist ein Zusammenhang zwischen pathologischen Spermatozoenformen und lysisinaktiven Spermatozoen vorstellbar. Für die Abklärung dieser Fragestellung wurde im Ausstrichpräparat eine Differenzierung der Spermatozoenmorphologie auf pathologische Kopf-, Mittelstück- und Schwanzformen pro 100 Spermatozoen vorgenommen. Der Prozentsatz lysisinaktiver Samenzellen ergab sich als Mittelwert aus 300 Spermatozoen eines Ejakulates.

Bei 93 untersuchten Ejakulaten lag der Mittelwert lysisinaktiver Zellen bei 25,9 Prozent. Zwischen der Prozentzahl pathologisch differenzierter Spermatozoen und der Anzahl lysisinaktiver Zellen bestand ein Korrelationskoeffizient von $r = 0,513$. Die Korrelationsanalyse zwischen pathologisch differenzierten Kopfformen und der Zahl lysisinaktiver Spermatozoen ergab einen Korrelationskoeffizient von $r = 0,205$.

Tab. 16: Übersicht über das Korrelationsverhalten zwischen
lysininaktiven Spermatozoen und Spermatozoenmorpho-
logie an Hand von 93 Ejakulaten.

r = Korrelationskoeffizient

T = Testgröße zur Prüfung der Nullhypothese $r = 0$

F = Freiheitsgrad

	<u>Differential - Spermatogramm</u>		
	Prozentsatz gesamtpatholog. Formen	Prozentsatz kopfpatholog. Formen	
Prozentsatz lysininakti- ver Zellen	0,513 5,704 ($p < 0,005$) 91	0,205 1,995 ($p < 0,025$) 91	r T F

3.2.5. Einfluß von Akrosininhibitoren auf die Gelatinolyse

Die Proteinase Akrosin wird bekanntlich durch spezifische Akrosininhibitoren in ihrer Wirkung reguliert. Es sollte deshalb geklärt werden, inwieweit die Methode der Gelatinolyse ein geeignetes Testverfahren für die Beurteilung der Hemmwirkung verschiedener Akrosininhibitoren auf die proteolytische Aktivität individueller Spermatozoen darstellt.

Mehrere Akrosinhemmstoffe (Trasylol, Leupeptin, SSPI, TLCK, p-NPGB) wurden geprüft, wobei sowohl ein Hemmstoffzusatz zum Sperma als auch eine Sättigung der Gelatinemembranen mit Inhibitoren erfolgte. Während die Versuchsreihe des Hemmstoffzusatzes zum Sperma eine Aussage über die Permeabilitätsfähigkeit einzelner Akrosinhemmstoffe durch die Akrosomenmembranen erlaubte, eignete sich das Verfahren der Gelatinesättigung mit Inhibitoren zur Bewertung des tatsächlichen Hemmpotentials der einzelnen Inhibitoren und

zur biochemischen Charakterisierung des gelatinolytischen Enzyms.

3.2.5.1. Hemmstoffzusatz zum Sperma

Nach ein 15 minütigen Inkubationszeit des Inhibitors mit den gewaschenen Spermatozoen konnte keiner der geprüften Hemmstoffe eine vollständige Hemmung der Halobildung erzielen. p-NPGB führte in Abhängigkeit von der Konzentration zur stärksten prozentualen Einschränkung des Halodurchmessers (32,4%). Trasylol (25,9%), TLCK (20,3%), SSPI (10,3%) und Leupeptin (3,8%) ließen in abnehmender Reihenfolge geringere bis minimale Hemmwirkung erkennen. Keiner der Hemmstoffe konnte die Angehrate der lysisaktiven Spermatozoen grundlegend beeinflussen (Tab. 17).

Tab. 17: Hemmstoffzusatz zum Sperma: Inkubation von Akrosin-inhibitoren mit gewaschenen ejakulierten menschlichen Spermatozoen und nachfolgende Bestimmung der gelatinolytischen Aktivität. Der Kontrollwert liefert den Bezugspunkt für die Berechnung der prozentualen Abweichung des Lysisdurchmessers unter Inhibitor-einfluß.

	<u>Kontrolle</u>		<u>10^{-4}M Inhibitor</u>			<u>10^{-3}M Inhibitor</u>		
	Durchm. (µm)	Lysisakt. Zellen(%)	Durchm. (µm)	Proz. Abw.	Lysisakt. Zellen(%)	Durchm. (µm)	Proz. Abw.	Lysisakt. Zellen(%)
Trasylol	19,4	81	17,3	-10,8	72	13,7	-29,4	72
	21,1	87	17,5	-17,1	86	16,1	-23,7	85
	19,7	86	17,0	-13,7	76	14,9	-24,7	79
Mitt.-W.	20,1	85	17,3	-13,9	78	14,9	-25,9	78
Leupeptin	19,7	86	19,2	- 3,6	78	20,4	+ 3,6	78
	20,2	81	20,7	+ 2,5	81	18,7	- 7,4	80
	22,6	89	22,6	0	80	20,9	- 7,5	85
Mitt.-W.	20,8	85	20,8	- 0,4	80	20,0	- 3,8	81
SSPI	20,2	81	18,7	- 7,4	76	19,7	+ 2,5	77
	23,5	81	24,0	+ 2,1	87	20,6	-12,3	85
	22,6	89	21,8	- 3,5	88	17,8	-21,2	82
Mitt.-W.	22,1	84	21,5	- 2,9	84	19,4	-10,3	81
TLCK	19,7	86	18,5	- 6,1	84	16,6	-15,7	78
	23,5	75	19,7	-16,2	83	19,4	-17,4	80
	24,7	84	21,8	-11,7	83	17,8	-27,9	85
Mitt.-W.	22,6	82	20,0	-11,3	83	17,9	-20,3	81
NPGb	22,6	89	20,2	-10,6	87	14,7	-34,9	82
	21,6	87	18,7	-13,4	92	13,9	-35,6	84
	18,7	76	16,6	-11,2	77	13,7	-26,7	72
Mitt.-W.	21,0	84	18,5	-11,7	85	14,1	-32,4	79

3.2.5.2. Membransättigung mit Akrosininhibitoren

Das Auftragen der Inhibitorlösungen auf die Gelatinemembranen und die nachfolgende 30 minütige Inkubation der gewaschenen Spermatozoen ergab im Gegensatz zu den Versuchen mit Hemmstoffzusatz zum Sperma eine vollständige Hemmung der Halobildung lysisaktiver Zellen durch Trasylol, Leupeptin, SSPI und p-NPGB bei Konzentrationen von $10^{-4}M$ und $10^{-3}M$. TLCK hingegen zeigte keine Hemmung der Halobildung. Auch längere Inkubationszeiten der Spermatozoen von 1 und 2 Stunden führten zu keiner Hemmung der Gelatinolyse durch TLCK. Eine Reduzierung lysisaktiver Zellen konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden (Tab. 18).

Tab. 18: Membransättigung mit Akrosininhibitoren: Sättigung der Gelatinemembran mit Akrosininhibitoren, 30 minütige Inkubation der gewaschenen Spermatozoen und nachfolgende Bestimmung der gelatinolytischen Aktivität.

		<u>Kontrolle</u>		<u>$10^{-4}M$ Inhibitor</u>			<u>$10^{-3}M$ Inhibitor</u>		
		Durchm. (μm)	Lysisakt. Zellen(%)	Durchm. (μm)	Proz. Lysisakt. Abw. Zellen(%)		Durchm. (μm)	Proz. Lysisakt. Abw. Zellen(%)	
Trasylol		21,4	72	vollständige Hemmung			vollständige Hemmung		
Leupeptin		21,6	87	vollständige Hemmung			vollständige Hemmung		
SSPI		21,4	72	vollständige Hemmung			vollständige Hemmung		
NPGB		21,6	85	vollständige Hemmung			vollständige Hemmung		
TLCK	30'	17,3	72	17,3	0	74	15,8	-8,7	75
	1 ^h	23,0	82	23,3	+1,3	76	21,6	-6,1	80
	2 ^h	27,1	79	25,4	-6,3	72	27,1	0	82

3.2.5.3. Spermatotoxizität der Inhibitoren

Es war die Frage zu klären, ob die verwendeten Inhibitoren in den vorgelegten Konzentrationen neben der Hemmung der gelatinytischen Aktivität möglicherweise auch eine toxische Wirkung auf die Spermatozoen ausüben würden. Als einfach durchzuführendes Testverfahren zur Prüfung eines spermatotoxischen Effektes der Inhibitoren diente die mikroskopische Beurteilung der Spermatozoenmotilität vor und nach Zugabe der Hemmstoffe.

Auf einen Objektträger wurden 10 μ l eines Ejakulates aufgetragen und unmittelbar bzw. 30 Minuten nach Zugabe von 10 μ l der zu prüfenden Inhibitorlösung die Motilität der Spermatozoen bestimmt. Als Kontrolle dienten 10 μ l Ejakulat im Verbindung mit 10 μ l Trispuffer, pH 8,2.

Unmittelbar nach Zugabe der Inhibitoren zum Ejakulat bewirkte kein Hemmstoff eine Änderung der prozentualen Motilitätsverteilung. Lediglich p-NPGB löste in Bezug auf die Qualität der Spermatozoenmotilität intensivere Schwanzbewegungen aus, die aber die Propulsivbeweglichkeit kaum verbesserten. Auch nach 30 Minuten war die Beweglichkeit der mit Trasylol, Leupeptin, SSPI und TLCK versetzten Spermatozoen gegenüber den Kontrollwerten nicht verringert. Der Einfluß von p-NPGB zeigte sich nach dieser Zeitspanne in einer deutlichen Reduktion der Propulsivbeweglichkeit auf etwa die Hälfte der vergleichbaren Motilität im Kontrollansatz (Tab. 19).

Tab. 19: Einfluß der Inhibitoren auf die Motilität der Spermatozoen.

Inhibitor	<u>1 min.-Inkubation</u>		<u>30 min.-Inkubation</u>	
	Kontrolle	Inhib.+Ejak.	Kontrolle	Inhib.+Ejak.
Trasylol	—	—	—	—
Leupeptin	—	—	—	—
SSPI	—	—	—	—
TLCK	—	—	—	—
p-NPGB	—	($\uparrow$)	—	$\downarrow$

4. Diskussion

Die Beurteilung eines Ejakulates im Rahmen der männlichen Fertilitätsdiagnostik stützt sich im allgemeinen auf makroskopische, mikroskopische und physikalisch-chemische Spermaparameter (SCHIRREN 1971; KRAUSE und GLAHN 1974; SCHIRREN 1975). Die Auswertung der Befunde orientiert sich dabei an international festgelegten Normwerten (Empfehlungen zur Nomenklatur der Andrologie, 1970). Dieses Bezugssystem basiert auf statistisch belegten Fertilitätsparametern, die an großen Patientenkollektiven gewonnen wurden, für den Einzelfall aber keine relevanten Aussagen erlauben. Für die Bestimmung der individuellen Fertilitätschancen ist es daher erforderlich, nach weiteren aussagekräftigen Parametern für die andrologische Diagnostik zu suchen.

Das akrosomale Penetrationsenzym Akrosin, das als Schlüsselenzym der Befruchtung gilt, stellt möglicherweise den Ansatzpunkt für einen neuen biochemischen Parameter in der Diagnostik der männlichen Infertilität dar. Durch die Bestimmung der Akrosinaktivität hofft man Aufschlüsse über das Penetrationsverhalten der Spermatozoen durch die Eihülle zu gewinnen.

SCHIRREN und EWEIS (1973) sowie SCHILL (1973a; 1974b; 1976a) führten erstmals photometrische Akrosinbestimmungen im Sperma des Menschen durch. Beiden Arbeitsgruppen gelang es, eine Korrelation zwischen der Spermatozoendichte und der Akrosinaktivität einer Spermatozoenpopulation nachzuweisen. Es bleibt jedoch zu berücksichtigen, daß die quantitative Akrosinbestimmung durch eine Reihe von Faktoren beeinträchtigt wird. Insbesondere scheinen akrosomale Membranfaktoren und das Vorliegen eines Proenzyms des Akrosins in die quantitative Enzymbestimmung mit einzugehen, so daß dadurch die Akrosinaktivität beeinflusst wird und die Interpretation der erhobenen

Befunde erschwert wird. Die klinische Bedeutung der Akrosinmessung ist daher vorläufig auf die Diagnostik der Globozoospermie begrenzt, bei der ausschließlich rundköpfige, akrosomenlose Spermatozoen im Ejakulat vorliegen (SCHILL, 1976c).

WENDT et al. (1975a,c) führten photometrische Akrosinbestimmungen in Kombination mit der gelatinolytischen Aktivitätsmessung bei Bullenejakulaten durch. Akrosin konnte dabei mit Hilfe spezifischer Hemmstoffe als das proteolytische Enzym identifiziert werden, welches allein für die gelatinolytische Wirkung verantwortlich ist. Es konnte eine gute Korrelation zwischen der photometrischen Akrosinaktivität einer Spermatozoenpopulation und der gelatinolytischen Aktivität individueller Spermatozoen gefunden werden ($r = 0,83$). Somit war es möglich, einzelne Samenzellen sowohl quantitativ als auch qualitativ hinsichtlich ihrer Akrosinaktivität zu beurteilen.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es festzustellen, ob auch bei Verwendung von Humansperma eine Korrelation zwischen der photometrisch gemessenen Akrosinaktivität einer Spermatozoenpopulation und der Lysisfläche individueller Samenzellen besteht. Dabei sollte der Einfluß verschiedener Ejakulatqualitäten auf die Größe der enzymatischen bzw. gelatinolytischen Aktivitäten der Spermatozoen untersucht werden. Ferner wurden einige Akrosininhibitoren auf ihre gelatinolytische Hemmwirkung hin überprüft.

Das Studium der Literatur zeigt, daß widersprüchliche Angaben über das gelatinolytische Verhalten verschiedener Ejakulatportionen bestehen. Einige Arbeitsgruppen benutzten zur Demonstration der Lysiswirkung von Säugetierspermatozoen ausschließlich gewaschene oder epididymale Samenzellen, da sie der Meinung sind, daß Inhibitoren des Seminalplasmas die Lysisentwicklung hemmen (GADDUM und BLANDAU, 1970;

GADDUM-ROSSE und BLANDAU, 1972; BENITEZ-BRIBIESCA-VELAZQUEZ-MEZA, 1972; ALLEN et al. (1974)). Dagegen fanden PENN et al. (1972) und WENDT et al. (1975a,c) keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Depolymerisationsflächen gewaschener, also spermaplasmafreier und ungewaschener Eber- und Bullenspermatozoen. Die eigenen Untersuchungen unter Verwendung von Humansperma ergaben signifikant größere Lysisflächen bei gewaschenen Spermatozoen im Vergleich zum Nativsperma. Dabei fiel auf, daß ein gewisser Prozentsatz der gewaschenen Spermatozoen beträchtlich größere Lysishöfe entwickelte als die Masse der übrigen spermaplasmafreien Samenzellen (vgl. Tab. 2. und Abb. 2.).

Für die Interpretation dieser Befunde ist es wichtig, die einzelnen Schritte des gelatinolytischen Prozesses zu kennen. Das zur Gelatinolyse führende Penetrationsenzym Akrosin ist im Bereich der inneren akrosomalen Membran lokalisiert (BROWN und HARTREE, 1974; SCHILL und WOLFF, 1974a,b,c; BROWN et al., 1975; MORTON, 1975) und wird durch die äußere akrosomale Membran und die Plasmamembran abgeschirmt. Eine Entfaltung der proteolytischen Wirkung von Akrosin ist somit nur möglich, wenn eine Freisetzung des Enzyms aus dem akrosomalen Membranverband erfolgt bzw. die genannten Schutzhüllen während der Akrosomenreaktion im Verlauf des Kapazitationsprozesses abgelöst werden. Andererseits können degenerative Membranveränderungen zur Freisetzung von Akrosin führen (ALLEN et al., 1974). Letzteres wird für das Phänomen der Gelatinolyse diskutiert, wobei die Einwirkung von Wasserdampf während der Inkubation der Spermatozoen im Reaktionsmilieu, die Verdünnung des Ejakulats vor Applikation der Samenzellen auf den Gelatinemembranen und der Kontakt der Spermatozoen mit Gelatine eine degenerative Membranreaktion bewirken (WENDT, 1974; WENDT et al., 1975a). Dabei wird angenommen, daß Plasmamembran und äußere

akrosomale Membran als Einheit von der Akrosomenkappe abgelöst werden. HIRSCHHÄUSER und BAUDNER (1975) sowie SCHILL et al. (1975b) konnten in diesem Zusammenhang zeigen, daß Seminalplasma-Trypsin-Inhibitoren mit der Plasmamembran der Spermatozoen relativ fest assoziiert sind. Aus diesem Grunde ist eine Inaktivierung des Enzyms durch die an den Spermatozoenmembranen gebundenen Akrosininhibitoren nicht zu erwarten, wenn es zur Freisetzung des Akrosins infolge der Membranalterationen kommt. Eine Einschränkung der gelatinolytischen Aktivität durch das Vorhandensein von membrangebundenen Seminalplasma-Inhibitoren konnte somit ausgeschlossen werden, was durch die übereinstimmenden Ergebnisse bei gewaschenen und ungewaschenen Bullen- und Eberspermatozoen durch PENN et al. (1972) und WENDT et al. (1975a) bestätigt wird. Die beobachteten größeren Lysiszonen gewaschener Humanspermatozoen in den eigenen Untersuchungen weisen darauf hin, daß andere Faktoren, z.B. die Waschprozedur als solche, die Lysisentwicklung beeinflussen können. Es ist leicht vorstellbar, daß die Akrosomenstruktur degenerierter oder überalteter Spermatozoen durch den Waschvorgang stärker geschädigt wird, so daß die nachfolgenden physikalischen Behandlungsmaßnahmen (Wasserdampf, Verdünnungseffekt) zu einer zusätzlichen bzw. vollständigen Freisetzung lysisaktiven Akrosins führen. Dies wird dadurch unterstrichen, daß Veränderungen des akrosomalen Membransystems von Humansperma durch den Waschprozeß bereits von FEDERSEN (1972b) beschrieben wurden.

Als weitere Ursache für das größere gelatinolytische Potential gewaschener menschlicher Spermatozoen im Gegensatz zum Nativsperma muß eine Aktivierung von Akrosin durch den Waschvorgang diskutiert werden. Jüngste Untersuchungen von SCHLEUNING et al. (1976) zur elektrophoretischen Charakterisierung von menschlichem Akrosin weisen in diese Richtung.

Aus den dargelegten Gründen war es deshalb sinnvoll, die Versuche zur Bestimmung der quantitativen gelatinolytischen Akrosinaktivität mit unbehandeltem Nativsperma durchzuführen, um das Ergebnis durch mechanische Manipulationen, wie z.B. den Waschprozeß nicht zu verfälschen.

Für die Versuche zur Gelatinolyse mit menschlichen Spermatozoen wurde Trispuffer als Inkubations-, Verdünnungs- und Waschmedium verwendet (WENDT et al., 1975a,c). Da ein Trispuffer mit einem pH-Wert von 7,2 dem physiologischen pH-Bereich menschlichen Spermas (SCHIRREN, 1971) entspricht, wurde dieser als Verdünnungs- und Waschmedium der Ejakulate verwendet. Im Gegensatz dazu stellte der Trispuffer mit einem pH-Wert von 8,2 einen optimalen pH-Bereich für die Entfaltung der gelatinolytischen Aktivität von Akrosin dar (WENDT et al., 1975a) und diente damit als Inkubationsmedium für die Gelatinemembranen.

Bakerlösung (pH 7,2) und physiologische Kochsalzlösung (pH 6,8) waren dagegen wegen morphologischer Veränderungen der Gelatinemembranen für die Methode der Gelatinolyse nicht geeignet (vgl. Abb. 3,4,5). Die Abnahme der durchschnittlichen Lysisflächen der Spermatozoen bei Verwendung von Baker- und Kochsalzlösung (Bakerlösung: 10 Prozent; physiologische Kochsalzlösung: 30-50 Prozent) ist auf den abweichenden pH-Wert für eine optimale gelatinolytische Aktivität zurückzuführen. Die erniedrigte Rate lysisaktiver Zellen unter Verwendung von physiologischer Kochsalzlösung weist auf eine Beeinflussung der degenerativen Akrosomenreaktion hin. Eine Möglichkeit besteht darin, daß Kochsalzlösung bereits während der Ejakulatverdünnung in einem Teil der Fälle eine Enzymfreisetzung bewirkt, so daß Akrosin für eine Halobildung nicht mehr zur Verfügung steht.

Die sofortige Beendigung des Fortschreitens der Lysisentwicklung durch eine Änderung des Reaktionsmilieus hat zur Folge,

daß eine Fixierung der Gelatinemembranen unnötig ist. Dies stimmt mit der Tatsache überein, daß die gelatinolytische Reaktion nur in wasserdampfgesättigter Atmosphäre stattfindet (GADDUM und BLANDAU, 1970; GADDUM-ROSSE und BLANDAU, 1972; BENITEZ-BRIBIESCA und VELAZQUEZ-MEZA, 1972; PENN et al., 1972; ALLEN et al., 1974; WENDT et al., 1975a).

SCHILL und FRITZ (1974) wiesen in ihren Untersuchungen über das Alterungsverhalten von Ejakulaten auf einen Anstieg der photometrisch gemessenen Akrosinaktivität 6 Stunden post ejaculationem bei Zimmertemperatur hin, wobei nach 48 bis 96 Stunden ein Maximum der Enzymaktivität erreicht war. Eigene Untersuchungen zum Problem der Beeinflussung der gelatinolytischen Aktivität durch Ejakulatalterung zeigten eine Zunahme der Lysiszonen 3 bis 4 Stunden post ejaculationem (vgl. Abb. 6). Diese Befunde weisen auf Veränderungen am akrosomalen Membransystem hin, die zu einer verbesserten Akrosinfreisetzung führen, bzw. läßt an eine Aktivierung des Akrosins denken.

Untersuchungen zur Kinetik der Gelatinolyse (vgl. Abb. 7a-d) sollten Aufschluß über die günstigste Inkubationsdauer der Ejakulate hinsichtlich einer guten mikroskopischen Auswertbarkeit der Lysiszonen ergeben. Dabei erwies sich eine Inkubationszeit von 30 Minuten bezüglich Größe und Kontrastierung der Halos als optimal.

Unter 500 facher mikroskopischer Vergrößerung konnte eine initiale Lysisreaktion bei menschlichen Spermatozoen etwa 2 Minuten nach Inkubation der Samenzellen entlang der gesamten Kopfkappe beobachtet werden. Im Gegensatz dazu ergaben entsprechende Untersuchungen von WENDT et al. (1975a,c) mit Bullen- und Eberspermatozoen eine initiale Lysisentwicklung nach 30 bis 60 Sekunden, die vom Äquatorialsegment ihren Ausgang nahm. Da das menschliche Akrosin mit Hilfe der Immunfluoreszenz (SCHILL et al., 1975a; GARNER et al., 1975; MORTON, 1975) und der Elektronenmikroskopie (BROWN und

HARTREE, 1974; SCHILL und WOLFE, 1974a,b,c; BROWN et al., 1975) im Bereich der gesamten inneren akrosomalen Membran lokalisiert werden konnte, stellt die Lysisentwicklung entlang der gesamten Akrosomenkappe eine Bestätigung dieser Befunde dar.

Die maximale Größe der Lysishöfe wurde nach 2 Stunden erreicht. Längere Inkubationszeiten ergaben eine kontinuierliche Abnahme der Lysiskreise und eine zunehmende Unschärfe und Entrundung der Depolymerisationszonen, was am ehesten auf eine Strukturveränderung der Gelatinemembranen unter den Inkubationsbedingungen zurückgeführt werden muß. Nach einer Inkubationszeit von 16 Stunden waren die Gelatinemembranen in ihrer Struktur vollständig zerstört.

Gelatine stellt ein heterogenes Substrat für verschiedene Proteasen dar (BERGSTROM, 1970). WENDT (1974) gelang es, die Spezifität der proteolytischen Wirkung von Bullenakrosin auf Gelatinemembranen nachzuweisen. In ähnlicher Weise ließ sich die spezifische proteolytische Wirkung menschlichen Akrosins belegen (vgl. 3.2.3.1. und 3.2.5.2.). Aufgrund der diffusen Zerstörung der Gelatinemembranen nach einer 16-stündigen Inkubationszeit muß jedoch angenommen werden, daß zusätzlich proteolytische Enzyme des Seminalplasmas auf das Gelatinesubstrat einwirken können (vgl. Tab. 4; Abb. 9-11). Durch die Verdünnung des Ejakulates im Rahmen der Versuchsanordnung wird das proteolytische Potential des Seminalplasmas jedoch entsprechend stark reduziert und entfaltet daher nur nach langen Inkubationszeiten seine Wirkung. Aufgrund der Vorversuche, die zur methodischen Abklärung der Gelatinolyse durchgeführt wurden, ergaben sich für die weitere Versuchsplanung folgende Feststellungen:

- a) Ungewaschene menschliche Spermatozoen (Nativsperma) zeigen im Durchschnitt eine geringere gelatinolytische Aktivität im Vergleich mit gewaschenen Spermatozoen.

Der Einfluß des Waschvorganges kann bei einzelnen Samenzellen zu überdurchschnittlich großen Lysiskreisen führen. Ungewaschene Spermatozoen sind aufgrund ihrer geringeren Standardabweichung für vergleichende Untersuchungen besser geeignet.

- b) Trispuffer pH 7,2 und pH 8,2 stellen für die Gelatinolyse ein geeignetes Inkubations- und Waschmedium dar. Bakerlösung und physiologische Kochsalzlösung sind wegen des niedrigeren pH-Wertes und ihres ungünstigen Einflusses auf die Morphologie der Gelatinemembranen nicht von Vorteil.
- c) Die gelatinolytische Reaktion der Spermatozoen ist streng an das geeignete Reaktionsmilieu gebunden (94 % Luftfeuchtigkeit; 37°C;). Aus diesen Gründen ist eine Fixierung der Gelatinemembranen nach Inkubationsende zum Abstoppen der Gelatinolyse nicht notwendig.
- d) Die Ejakulatalterung bei Zimmertemperatur bewirkt eine Zunahme der photometrisch gemessenen Akrosinaktivität bzw. der gelatinolytischen Aktivität. Die kritische Zeitgrenze für eine meßbare Aktivitätszunahme liegt für die enzymatische Bestimmungsmethode bei 6 Stunden p.e., für die Gelatinolyse bei 3 Stunden p.e..
- e) Die Entwicklung der Lysishöfe der menschlichen Spermatozoen beginnt nach einer Inkubationszeit von 2 Minuten entlang der gesamten Akrosomenkappe. Die Lysishöfe nehmen mit zunehmenden Inkubationszeiten kontinuierlich an Größe zu, bis sie nach 2 Stunden ein Maximum erreicht haben. Eine längerdauernde Inkubation führt zur Unschärfe der Lysishöfe bis hin zur vollständigen Zerstörung der Gelatinemembranen. Für eine optimale mikroskopische Auswertbarkeit der Lysiszonen ist eine Inkubationszeit von 30 Minuten anzustreben.

- f) Der gelatinolytischen Reaktion liegt eine lokale und spezifische Wirkung der akrosomalen Proteinase Akrosin zugrunde. Eine nach Stunden einsetzende diffuse Proteolyse der Gelatinemembranen beruht auf der Anwesenheit von Seminalplasma-proteinasen.

Die photometrische Akrosinbestimmung menschlicher Spermatozoen wurde parallel zur quantitativen Auswertung der gelatinolytischen Enzymaktivität durchgeführt. Dabei sollte der Einfluß unterschiedlicher Ejakulatqualitäten auf die Höhe der Akrosinaktivitäten geprüft werden.

Mit Hilfe der essigsäuren Extraktion in Kombination mit dem BAEE/ADH-Test (FINK et al., 1972; FRITZ et al., 1972a; SCHILL, 1973a; 1974a) war es möglich, die Akrosinaktivität der Spermatozoen quantitativ zu bestimmen. Die aus den Spermatozoen extrahierbare Akrosinaktivität betrug durchschnittlich $37,4 \pm 26,3$ mU/ml Ejakulat bzw. $0,71 \pm 0,22$ mU/ 10^6 Spermatozoen, wobei 97 Ejakulate unterschiedlicher Spermaqualität berücksichtigt wurden. Zwischen der Akrosinaktivität (mU/ml) und der Spermatozoendichte (Mill/ml) bestand eine gute Korrelation ($r = 0,759$; vgl. Tab. 6). Damit konnten Ergebnisse früherer Arbeiten bestätigt werden (SCHIRREN und EWEIS, 1973; SCHILL, 1974a,b; 1976a).

Eine qualitative Aufteilung der untersuchten Ejakulate nach den spermatologischen Kriterien Normo-, Oligo-, Astheno- und Polyzoospermie ergab für die Gruppe der Oligozoospermie die höchsten Akrosinaktivitäten (vgl. Tab. 7; Tab. 9). Dies weist auf akrosomale Membranaliterationen in diesem Patientenkollektiv hin und zeigt, daß die akrosomalen Membranverhältnisse innerhalb der einzelnen Ejakulatgruppen die essigsäure Extraktion von Akrosin beeinflussen können (SCHILL, 1976a). Man kann sich vorstellen, daß Alterationen der akrosomalen Membranmorphologie, wie sie im allgemeinen bei Ejakulaten mit Oligozoospermie gefunden werden (SCHIRREN, 1971; BROTHERTON und

BARNARD, 1974) eine Verbesserung der Akrosinextraktion und damit eine Zunahme der Enzymaktivität bewirken. Trifft diese Theorie zu, könnten aus der Höhe der Akrosinaktivität Rückschlüsse auf den aktuellen Membranzustand des Akrosoms gezogen werden.

Neben der Membrantheorie kann der Aktivitätsanstieg bei Oligozoospermie durch enzymspezifische Veränderungen bedingt sein. So wird diskutiert, daß bei ejakulierten Spermatozoen Akrosin teilweise als inaktives Proenzym vorliegt, das durch den Kapazitationsprozeß schließlich vollständig aktiviert wird (AUSTIN, 1969; ZANEVELD et al., 1971c). Erfolgt die Aktivierung dieser Akrosinvorstufen bereits vor oder während der Ejakulation, würde daraus eine Zunahme der Enzymaktivität resultieren (SCHILL, 1976a). Die Höhe der Akrosinaktivität wäre bei dieser Hypothese ein Parameter für den Aktivierungszustand von Akrosin.

Die ungleichmäßige Akrosinfreisetzung aufgrund von Membraneinflüssen bzw. Aktivierungsvorgängen spiegelt sich auch in dem mäßiggradigen Korrelationsverhalten zwischen der Akrosinaktivität und der Spermatozoendichte bei Ejakulaten der Gruppe Oligozoospermie wieder (vgl. Tab. 6). Ein sinngemäß umgekehrtes Verhalten zeigt die Gruppe der Normozoospermie. Für diese Ejakulate wurde der höchste Korrelationskoeffizient ermittelt (vgl. Tab. 6).

Die statistische Analyse der photometrisch bestimmten Akrosinaktivitäten ergab signifikante Unterschiede zwischen der Gruppe mit Normozoospermie und Ejakulaten mit Spermatozoendichten unter 20 Mill/ml (vgl. Tab. 10). Es scheint ein Zusammenhang zwischen der eingeschränkten Fertilität und dem akrosomalen Membranzustand bei Ejakulaten mit geringeren Spermatozoendichten zu existieren.

Signifikante Unterschiede der Akrosinaktivität ließen sich auch zwischen den Normozoospermieuntergruppen 40-80 Mill/ml

und 80-120 Mill/ml sowie 120-250 Mill/ml nachweisen (vgl. Tab. 10), wobei das Signifikanzverhalten zwischen der ersten und letzten Gruppe zunahm. Dieser Befund geht mit der Beobachtung einher, daß die niedrigsten Akrosinaktivitäten in der Gruppe mit den höchsten Spermatozoendichten gemessen wurden (vgl. Tab. 9). Man könnte vermuten, daß die beschleunigte Proliferationsrate der Spermatozoen mit der Höhe der Akrosinaktivität interferiert. In klinischer Übereinstimmung mit diesem Ergebnis wurden Fertilitätsstörungen bei hohen Spermatozoendichten beobachtet.

Zwischen den Gruppen Normozoospermie und Asthenozoospermie bestanden keine signifikanten Unterschiede (vgl. Tab. 8). Dies entspricht der Tatsache, daß eine verminderte Beweglichkeit der Spermatozoen auf pathologische Veränderungen im Mittelstück und Schwanzteil der Samenzellen zurückzuführen ist und durch akrosomale Enzymveränderungen nicht beeinflußt wird.

Die Untersuchungen zur gelatinolytischen Aktivität menschlicher Spermatozoen erfolgten nach der von PENN et al. (1972) und WENDT et al. (1975a,c) angegebenen Methode zur Gelatinolyse. Es wurden sowohl quantitative als auch qualitative Studien über das gelatinolytische Verhalten individueller menschlicher Spermatozoen durchgeführt. Es war zu prüfen, ob eine Beziehung zwischen der photometrisch und gelatinolytisch bestimmten Proteinaseaktivität besteht. Insbesondere interessierte der Einfluß unterschiedlicher Ejakulatgruppen auf die Höhe der Akrosinaktivitäten. Ferner wurde die Auswirkung der Spermatozoenmorphologie auf die Rate der lysisaktiven Samenzellen untersucht. Schließlich wurde die Wirkung spezifischer Akrosininhibitoren auf die gelatinolytische Akrosinaktivität überprüft.

Die Bestimmung der durchschnittlichen Lysisfläche von

150 Spermatozoen eines Ejakulates diene als Maß für die Erfassung der gelatinolytischen Enzymaktivität. Dabei ergab sich für das Gesamtkollektiv der untersuchten Ejakulate eine mittlere Lysisfläche der lysisaktiven Zellen von $289,6 \pm 72,9 \mu\text{m}^2$ (Inkubationszeit: 30 Minuten; vgl. Tab. 12). Der Korrelationskoeffizient zwischen der Lysisfläche (μm^2) und der photometrisch bestimmten Akrosinaktivität ($\text{mU}/10^6\text{Sp}$) menschlicher Spermatozoen betrug $r = 0,625$ (vgl. Tab. 11). WENDT et al. (1975a,c) fanden bei ihren Untersuchungen unter Verwendung von Bullenejakulaten ein höheres Korrelationsverhalten ($r = 0,83$). Sie bewiesen damit, daß die Methode der Gelatinolyse ein geeignetes Verfahren für die quantitative Akrosinbestimmung individueller Spermatozoen darstellt. Bei der Diskussion der unterschiedlich hohen Korrelationskoeffizienten muß berücksichtigt werden, daß WENDT et al. ihre Versuche mit einer geringen Zahl von Ejakulat Spendern durchführten (8 Bullen als Ejakulatspender, 82 Ejakulate). Es ist leicht vorstellbar, daß bei einer kleinen Zahl von Ejakulat Spendern die individuellen Streuungen geringer werden im Vergleich zu den eigenen Untersuchungen, die an Ejakulaten von 97 Probanden durchgeführt worden waren. Daneben können speziesspezifische Faktoren, die das Korrelationsverhalten ebenfalls beeinflussen können, nicht ausgeschlossen werden.

Es wurde beobachtet, daß mit der Abnahme der Spermatozoendichte eine Zunahme der Lysisfläche und umgekehrt einherging (vgl. Tab. 12). Die Korrelationsanalyse zwischen der Lysisfläche (μm^2) und der enzymatischen Akrosinaktivität ($\text{mU}/10^6\text{Sp}$) ergab, daß Ejakulate mit Normozoospermieeigenschaften den höchsten Korrelationskoeffizient ($r = 0,702$), Ejakulate aus der Gruppe der Oligozoospermie hingegen den niedrigsten Korrelationskoeffizienten ($r = 0,521$) besaßen. Eine gleichsinnige Korrelationsabstufung ergab sich aus

der Analyse der photometrisch bestimmten Akrosinaktivitäten in Beziehung zur Spermatozoendichte (vgl. Tab. 6). Dieses Verhalten weist darauf hin, daß die Bestimmung der Akrosinaktivität sowohl im BAEE/ADH-Test nach essigsaurer Akrosinextraktion als auch in der Gelatinolyse nach physikalischer Enzymfreisetzung durch den Zustand der akrosomalen Membransysteme beeinflußt wird.

Ejakulate mit Spermatozoendichten unter 20 Mill/ml ließen sich von der Gruppe Normozoospermie durch ihre größeren Lysisflächen signifikant unterscheiden (vgl. Tab. 15). Identische Ergebnisse lieferte die Signifikanzanalyse aufgrund der enzymatischen Akrosinaktivitäten (vgl. Tab. 10). Der überraschende Befund, daß Ejakulate mit Spermatozoendichten unter 20 Mill/ml signifikant höhere enzymatische Akrosinaktivitäten entwickelten als Ejakulate mit Normozoospermie (vgl. Tab. 9; Tab. 10) konnte somit durch das Verhalten im Gelatinolysetest bestätigt werden. Der Nachweis höherer Akrosinaktivitäten steht der klinischen Beobachtung entgegen, daß Ejakulate mit geringen Spermatozoendichten in ihrem Fertilitätspotential eingeschränkt sind. Die erhöhten Akrosinaktivitäten bei diesen Ejakulaten dürfen aus diesem Grunde nicht als Ausdruck einer verbesserten Fertilität sondern als direktes Maß für den alterierten Zustand des akrosomalen Membransystems gewertet werden. In diesem Zusammenhang sei nochmals auf die möglicherweise stattfindende vorzeitige Enzymaktivierung bei Ejakulaten der Gruppe Oligozoospermie erinnert.

Schließlich konnten die Ergebnisse der Signifikanzanalyse bei photometrischer Akrosinbestimmung in den Untergruppen der Normozoospermie (vgl. Tab. 10) durch die gelatinolytische Aktivitätsbestimmung nicht reproduziert werden (vgl. Tab. 15). Es kann daraus gefolgert werden, daß das Verfahren der photometrischen Akrosinbestimmung mit dem kombinierten BAEE/ADH-Test im Vergleich zur Gelatinolyse die empfindlichere und

genauere Methode für die quantitative Akrosinmessung darstellt.

Nicht alle Spermatozoen eines menschlichen Ejakulates ließen eine Lysisentwicklung erkennen. 25,9 Prozent aller Spermatozoen waren lysisinaktiv. Dabei korrelierte die Rate der lysisinaktiven Zellen in einem höheren Maß mit der Prozentzahl aller pathologischen Spermatozoenformen ($r = 0,513$; Kopf- Mittelstück- Schwanzform) als mit der Prozentzahl pathologischer Kopfformen allein ($r = 0,205$; vgl. Tab. 16). Dieses Ergebnis weist darauf hin, daß akrosomale Enzymveränderungen nicht nur bei pathologischen Kopfalterationen der Samenzellen zu erwarten sind, sondern auch bei abnormer Morphologie von Mittelstück und Schwanz vorkommen. Daraus wird abgeleitet, daß die im Ausstrich als pathologisch zu klassifizierenden Spermatozoen oftmals auch akrosomale Defekte aufweisen. Die Zahl der lysisinaktiven Zellen im Vergleich zur Zahl aller pathologischen Spermatozoenformen ergibt somit erste orientierende Hinweise auf die Häufigkeit akrosomaler Enzymstörungen bei pathologischen Spermatozoenformen. Man kann sich folgendes Differenzierungsschema vorstellen:

- a) Enzymstörungen ohne Verbindung mit morphologischen Veränderungen: lysisinaktive Rate $>$ Prozentzahl pathologischer Zellen.
- b) Enzymstörungen in Verbindung mit morphologischen Veränderungen: lysisinaktive Rate $=$ Prozentzahl pathologischer Zellen.
- c) Morphologische Veränderungen ohne Verbindung mit Enzymstörungen: lysisinaktive Rate $<$ Prozentzahl pathologischer Zellen.

In der vorliegenden Arbeit wurde neben der Beurteilung der gelatinolytischen Aktivität menschlicher Spermatozoen auch die Frage der spezifischen Hemmbarkeit von Akrosin mit Hilfe der Gelatinolyse untersucht. Wie bereits besprochen wird im Verlauf der Gelatinolyse Akrosin aus dem akrosomalen Membranverband der Spermatozoen freigesetzt, während die Akrosin-inhibitoren des Seminalplasmas an die akrosomalen Membranbestandteile gebunden bleiben. Voraussetzung für die Hemmung des Akrosins im Bereich der inneren akrosomalen Membran ist aber, daß die Hemmstoffe die Plasmamembran und die äußere akrosomale Membran penetrieren können, um Akrosin-Hemmstoff-Komplexe zu bilden. Aufgrund dieser Kenntnisse bietet sich die Möglichkeit, verschiedene Akrosininhibitoren auf ihr Penetrationsvermögen durch den akrosomalen Membranapparat mit Hilfe der Gelatinolyse zu überprüfen. Bei einem Zusatz der Hemmstoffe zum Ejakulat ist eine wirksame Hemmung der Halobildung nur möglich, wenn es bereits vor der Inkubation der Spermatozoen auf den Gelatineplatten zu einer Akrosin-Inhibitor-Komplexbildung gekommen ist. Orientierende Untersuchungen (vgl. Tab. 17) zeigten, daß keiner der geprüften Inhibitoren imstande war, das akrosomale Membransystem soweit zu durchdringen, daß Akrosin im Bereich der inneren Akrosomenmembran vollständig gehemmt wird. Da die Versuche an gewaschenen Spermatozoen durchgeführt wurden, kann festgestellt werden, daß auch der membranalterierende Einfluß des Waschvorgangs auf das akrosomale Membransystem keine ausreichende Inhibitorpassage ermöglichte. Lediglich NPGb zeigt eine starke Beeinträchtigung der gelatinolytischen Aktivität, wobei die Hemmung der Gelatinolyse von NPGb über Trasylol, TLCK, SSPI und Leupeptin abnahm (vgl. Tab. 17).

Wurden die Gelatinemembranen vor der Applikation der Spermatozoen mit Inhibitorlösung gesättigt, zeigten Trasylol,

Leupeptin, SSPI und NPGb eine vollständige Hemmung der Gelatinolyse (vgl. Tab. 18). Es wird angenommen, daß nach Ablösen der äußeren Akrosomenhüllen während des Inkubationsvorganges Akrosin freigesetzt wird und somit mit der umgebenden Inhibitorlösung unter Bildung von inaktiven Komplexen reagieren kann. Die vollständige Hemmung der Gelatinolyse durch Sättigung der Membranen mit Hemmstoffen unterstreicht schließlich die Annahme, daß Akrosin und nicht eine andere Proteinase für die gelatinolytische Reaktion verantwortlich ist. TLCK zeigte unter den Bedingungen der Membransättigung mit Inhibitoren keine eindeutige Hemmwirkung, während der Hemmstoffzusatz zum Ejakulat eine 20 prozentige Reduktion der Lysisentwicklung erkennen ließ (vgl. Tab. 17; Tab. 18). Dieses Verhalten kann sowohl durch eine verzögerte Kinetik der Komplexbildung vom Typ der Progressivhemmung im Rahmen der Membransättigung mit Inhibitoren als auch durch unbekannte toxische Faktoren während des Hemmstoffzusatzes zum Ejakulat erklärt werden.

Um einen toxischen Einfluß der Hemmstoffe auf den Spermatozoenstoffwechsel auszuschließen, wurde die Spermatozoenmotilität vor und nach Zusatz der entsprechenden Inhibitorlösung ($10^{-4}M$; $10^{-3}M$) geprüft. Mit Ausnahme von NPGb ließ kein Hemmstoff eine Abnahme der Propulsivbeweglichkeit bzw. eine Veränderung des Motilitätsmusters erkennen. Dagegen muß beim NPGb neben der spezifischen Hemmwirkung auf das Akrosin eine toxische Inhibitoreinwirkung mit berücksichtigt werden (Tab. 19).

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden an Hand von 97 Ejakulaten andrologischer Patienten vergleichende Untersuchungen zur spektralphotometrisch bestimmbaren Akrosinaktivität einer Spermatozoenpopulation und der gelatinolytischen Aktivität individueller Samenzellen unter Berücksichtigung verschiedener Ejakulatqualitäten durchgeführt. Für die photometrische Akrosinbestimmung wurde Akrosin mit 2% Essigsäure aus dem Akrosom der Spermatozoen extrahiert und mit Hilfe des kombinierten BAEE/ADH-Testsystems quantitativ erfaßt. Bei der Methode der Gelatinolyse diente die Fläche der sich um den Spermatozoenkopf entwickelnden Depolymerisationszone im Gelatinesubstratfilmtest als quantitatives Maß der Akrosinaktivität.

Zwischen der Spermatozoendichte und der photometrisch gemessenen Akrosinaktivität besteht eine deutliche Korrelation (Korrelationskoeffizient $r = 0,759$). Der Mittelwert der enzymatischen Akrosinaktivität des Gesamtkollektivs ($n = 97$) betrug $0,71 \pm 0,22 \text{ mU}/10^6$ Spermatozoen. Bei Ejakulaten mit niedrigen Spermatozoendichten ($< 20 \text{ Mill/ml}$) wurden im Vergleich mit der Gruppe Normozoospermie signifikant höhere Enzymaktivitäten gemessen. Ejakulate mit Spermatozoendichten $> 80 \text{ Mill/ml}$ zeigten im Vergleich mit Ejakulaten der Gruppe $40\text{--}80 \text{ Mill/ml}$ signifikant niedrigere Akrosinaktivitäten. Zwischen Normozoospermie und Asthenozoospermie bestanden keine signifikanten Unterschiede.

Zwischen der photometrisch gemessenen und der durch Gelatinolyse bestimmten Akrosinaktivität besteht eine deutliche Korrelation (Korrelationskoeffizient $r = 0,625$). Die durchschnittliche Lysisfläche betrug $289,6 \pm 72,7 \mu\text{m}^2$. Ejakulate mit Spermatozoendichten $< 20 \text{ Mill/ml}$ ergaben im Vergleich

zu Ejakulaten mit Normozoospermie signifikant größere Lysisflächen. Bei der Bildung von Untergruppen im Kollektiv der Normozoospermie (40-80 Mill/ml; 80-120 Mill/ml; 120-250 Mill/ml) konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Ebenso bestanden zwischen Normozoospermie und Asthenozoospermie keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Größe der Lysisflächen.

Ein Vergleich der Spermatozoenmorphologie mit der Rate lysisinaktiver Zellen ergab, daß die prozentuale Anzahl aller pathologischen Spermatozoenformen (Kopf, Mittelstück, Schwanz) in einem höheren Maße mit der Rate lysisinaktiver Zellen korrelierte (Korrelationskoeffizient $r = 0,513$) als der prozentuale Anteil pathologischer Kopfformen allein (Korrelationskoeffizient $r = 0,205$).

Bei Zusatz von Akrosininhibitoren zu gewaschenen Spermatozoen führten die Hemmstoffe Leupeptin, SSPI, TLCK, Trasylol und p-NPGB mit zunehmender Reihenfolge und in Abhängigkeit von der Konzentration ($10^{-4}M$; $10^{-3}M$) zu einer bis zu 30 prozentigen Hemmung der Lysishöfe im Vergleich zum Kontrollansatz. Bei der Sättigung der Gelatinemembranen mit Inhibitoren unterdrückten Trasylol, Leupeptin, SSPI und p-NPGB die Lysisbildung vollständig, während TLCK keine Hemmung der Lysisentwicklung erkennen ließ. Aufgrund der Hemmstoffversuche muß es sich bei dem gelatinolytischen Enzym daher um Akrosin handeln.

Die Ergebnisse zeigten, daß die Bestimmung der Akrosinaktivität mittels Spektrophotometrie und Gelatinolyse vergleichbare Resultate liefern. Der Vorteil der spektrophotometrischen Methode ist ihre bessere Reproduzierbarkeit, so daß sie auch zu eindeutigeren statistischen Aussagen im Hinblick auf die verschiedenen Ejakulatgruppen führt. Nicht zuletzt ist die photometrische Akrosinbestimmung wegen des

einfacheren methodischen Verfahrens für die quantitative Enzymbestimmung besser geeignet. Sowohl die durch Essigsäure extrahierbare Akrosinaktivität als auch die Gelatineproteolyse sind in hohem Maße vom akrosomalen Membranzustand der Spermatozoen und dem Aktivierungsgrad des Akrosins abhängig. Beide Verfahren eignen sich daher im Prinzip für den Nachweis lichtmikroskopisch nicht faßbarer Membranaliterationen am Akrosom bzw. stellen einen Indikator für den Aktivierungszustand des Akrosins dar.

Der Vorteil der Gelatinolyse liegt vor allem darin, die Akrosinaktivität einzelner Spermatozoen zu bestimmen. Außerdem eignet sich diese Methode hervorragend für die Beurteilung des Penetrationsverhaltens von synthetischen Akrosinhemmstoffen durch die Akrosomenmembranen. Letzteres ist von großer Bedeutung auf der Suche nach geeigneten membrangängigen Hemmstoffen, die das im Bereich der inneren akrosomalen Membran lokalisierte Akrosin erreichen können, um zur Bildung von Akrosin-Inhibitor-Komplexen zu führen. Letzteres würde die Basis für eine antienzymatische Kontrazeption auf der Ebene der Penetrationsenzyme schaffen.

6. Literatur

ALLEN, G.J., BISHOP, M.W.H. and T.E. THOMPSON: Lysis of photographic emulsions by mammalian and chicken spermatozoa. J.Reprod.Fert. 36, 249-252 (1974)

ALLISON, A.C. and E.F. HARTREE: Lysosomal enzymes in the acrosome and their possible role in fertilization. J.Reprod. Fert. 21, 501-515 (1970)

AUSTIN, C.R.: Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. Aust.J.Sci.Res.B. 4, 581-589 (1951)

AUSTIN, C.R.: Sperm capacitation - Biological significance in various species.
In: Advances in the Biosciences 4, 1
Schering Symposium 1969; Pergamon Press

AUSTIN, C.R., BAVISTER, B.D. and R.G. EDWARDS: The regulation of mammalian reproduction
ed. S.J. Segal, T. Crozier, P.A. Corfman, P.G. Candliffe,
247-254, Springfield: Thomas 586 pp.(1973)

BARROS, C. and R. YANAGIMACHI: Induction of zona reaction in golden hamster eggs by cortical granule material. Nature (Lond.) 233, 268-269 (1971)

BARROS, C., BEDFORD, J.M., FRANKLIN, L.E. and C.R. AUSTIN: Membrane vesiculation as a feature of the mammalian acrosome reaction. J.Cell.Biol. 34, C1-C5 (1967)

BEDFORD, J.M.: Morphological aspects of sperm capacitation in mammals.

In: Advances in the Biosciences 4,: 35
Schering Symposium 1969; Pergamon Press

BEDFORD, J.M.: Sperm capacitation and fertilization in mammals.

Biol.Reprod. 2, Suppl. 2, 128-158 (1970)

BENITEZ-BRIBIESCA, L. and S. VELAZQUEZ-MEZA: Cytochemical demonstration of proteolytic activity of human and rat spermatozoa.

J.Reprod.Fert. 29, 419-420 (1972)

BERGSTROM, S.: Estimation of proteolytic activity at mouse implantation sites by the gelatin digestion method.

J.Reprod.Fert. 23, 481-485 (1970)

BHALLA, V.K., DOHANIAN, A.O., NEWELL, S.O. and W.L. WILLIAMS: Properties and improved assay of decapacitation factor.

Fedn.Proc. 31, 364, Abs. 278 (1972)

BRACKETT, B.G., SEITZ, H.M.Jr., ROCHA, G. and L.Jr.

MASTROIANNI: Biology of mammalian fertilization and implantation

ed. K.S. Moghissi, E.S.E. Hafez, 165-184, Springfield: Thomas (1972)

BROTHERTON, J. and G. BARNARD: Estimation of number, mean size and size distribution of human spermatozoa in oligospermia using a coulter counter.

J.Reprod.Fert. 40, 341-357 (1974)

BROWN, C.R. and E.F. Hartree: Distribution of a trypsin-like proteinase in the ram spermatozoon.

J.Reprod.Fert. 36, 195-198 (1974)

BROWN, C.R., ANDANI, Z. and E.F. HARTREE: Studies on ram acrosin. Isolation from spermatozoa, activation by cations and organic solvents, and influence of cations on its reaction with inhibitors.

Biochem.J. 149, 133-146 (1975)

CHANG, M.C.: Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the Fallopian tubes.

Nature (Lond.) 168, 697 (1951)

CHANG, M.C.: A detrimental effect of seminal plasma on the fertilizing capacity of sperm.

Nature, London, 179, 258 (1957)

CONRAD, K., BUCKLEY, J. and R. STAMBAUGH: Studies on the nature of the block to polyspermy in rabbit ova.

J.Reprod.Fert. 27, 133-135 (1971)

DICKMANN, Z.: Sperm penetration into and through the zona pellucida of the mammalian egg.

In: Preimplantation stages of pregnancy.

Hrsg: G.E.W. Wostenholme and M. O'Connor.

Churchill, London (1965)

DOTT, H.M. and J.P. DINGLE: Distribution of lysosomal enzymes in the spermatozoa and cytoplasmic droplets of bull and ram.

Exp.Cell.Res. 52, 523-540 (1968)

ELIASSON, R.: Standards for investigation of human semen.
Andrologie 3, 49-64 (1971)

Empfehlungen zur Nomenklatur in der Andrologie:
Andrologie 2, 186-187 (1970)

ERDÖS, E.G.: Bradykinin, Kallidin und Kallikrein.
In: Eichler, O., Farah, A., Herken, H. und A.D. Welch
"Handbuch der experimentellen Pharmakologie", Band XXV.
Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - New York 1970

ERICSSON, R.J. and D.A. BUTHALA: A fluorescence staining
method for studying sperm membranes
Biol.Reprod. 3, 8 (1970)

FAWCETT, D.W.: The mammalian spermatozoon.
Developmental Biology 44, 394-436 (1975)

FINK, E., KLEIN, G., HAMMER, F., MÜLLER-BARDORFF, G. and
H. FRITZ: Protein proteinase inhibitors in male sex glands.
In: Fritz, H. and H. Tschesche "Proc.Int.Res.Conf.Proteinase
Inhibitors, Munich 1970", S. 225-235, Walter de Gruyter,
Berlin - New York 1971

FINK, E., SCHIESSLER, H., ARNHOLD, M. und H. FRITZ:
Isolierung eines Trypsin-ähnlichen Enzyms (Akrosin) aus
Eberspermien.
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 353, 1633-1637 (1972)

FINK, E., FRITZ, H., JAUMANN, E., SCHIESSLER, H., FÖRG-BREY, B. and E. WERLE: Protein proteinase inhibitors in male sex glands and their secretions.

In: Peeters, H. "Protides of the Biological Fluids, Proc. 20th Coll.Brugge 1972". S. 425-431, Pergamon Press, Oxford 1973

FRANKLIN, L.E., BARROS, C. and E.N. FUSELL: The acrosomal region and the acrosomal reaction in sperm of the golden hamster.

Biol.Reprod. 3, 180-200 (1970)

FRASER, L.R., DANDEKAR, P.V. and R.A. VAIDYA: In vitro fertilization of tubal rabbit ova partially or totally denuded of follicular cells.

Biol.Reprod. 4, 229-233 (1971)

FREY, E.K., KRAUT, H. und E. WERLE: Das Kallikrein-Kinin-System und seine Inhibitoren. 2.neubearb. Aufl., Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 1968

FRITZ, H., TRAUTSCHOLD, I., HAENDLE, H. and E. WERLE: Chemistry and biochemistry of proteinase inhibitors from mammalian Tissues.

Ann.N.Y.Acad.Sci. 146, 400-413 (1968)

FRITZ, H., FINK, E. und R. MARX: Ansatzpunkte für eine antienzymatische Kontrazeption.

In: Sexualhormone und Blutgerinnung, XIV. Hamburg Symposium über Blutgerinnung. Hrsg.: Marx, R. und H.A. Thies Verlag Schattauer, F.K., Stuttgart, N.Y. (1971)

FRITZ, H., FÖRG-BREY, B., FINK, E., SCHIESSLER, H., JAUMANN, W. und M. ARNHOLD: Charakterisierung einer Trypsin-ähnlichen Proteinase (Akrosin) aus Eberspermen durch ihre Hemmbarkeit mit verschiedenen Protein-Proteinase-Inhibitoren. I. Seminale Trypsininhibitoren und Trypsin-Kallikrein-Inhibitor aus Rinderorganen.

Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 353, 1007-1009 (1972a)

FRITZ, H., FÖRG-BREY, B., FINK, E., MEIER, M., SCHIESSLER, M. und M. SCHIRREN: Humanakrosin: Gewinnung und Eigenschaften.

Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 353, 1943-1949 (1972b)

FRITZ, H., FÖRG-BREY, B., MEIER, M. ARNHOLD, M. und H. TSCHESCHE: Humanakrosin: Hemmbarkeit durch Protein-Proteinase-Inhibitoren.

Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 353, 1950-1952 (1972c)

FRITZ, H., HEIMBURGER, N., MEIER, M., ARNHOLD, M., ZANEVELD, L.J.D. und G.F.B. SCHUMACHER: Humanakrosin: Zur Kinetik der Hemmung durch Human-Seruminhibitoren.

Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 353, 1953-1956 (1972d)

FRITZ, H., FÖRG-BREY, B. and H. UMEZAWA: Leupeptin and antipain-strong competitive inhibitors of sperm acrosomal proteinase (boar acrosin) and kallikreins from porcine organs (pancreas, submand. glands, urine).

Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 354, 1304-1306 (1973a)

FRITZ, H., SCHIESSLER, H. and W.-D. SCHLEUNING: Proteinases and Proteinase Inhibitors in the fertilization process: new concepts of control.

Advances in the Biosciences 10, 271-286 (1973b)

FRITZ, H., SCHLEUNING, W.-D. and W.-B. SCHILL: Biochemistry and clinical significance of the trypsin-like proteinase acrosin from boar and human spermatozoa.

In: Fritz, M., Tschesche, M., Greene, L.J., and E. Truscheit "Bayer-Symposium V, Proteinase Inhibitors", S. 118-127, Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York 1974

FRITZ, H., SCHIESSLER, H., SCHLEUNING, W.-D., SCHILL, W.-B., WENDT, V., und G. WINKLER: Boar, bull and human sperm acrosin: isolation, properties and biological aspects.

In: Reich, E., Rifkin, D. und E. Shaw (Hrsg.) "Proteases and Biological Control", S. 715-735, Cold Spring Harbor Laboratory 1975a

FRITZ, H., SCHIESSLER, H., SCHILL, W.-B., TSCHESCHE, H., HEIMBURGER, N. und O. WALLNER: Low molecular weight proteinase (acrosin) inhibitors from human and boar seminal plasma and spermatozoa and human cervical mucus: isolation, properties and biological aspects.

In: Reich, E., Rifkin, D. und E. Shaw (Hrsg.) "Proteases and Biological Control", S. 737-766, Cold Spring Harbor Laboratory 1975b

FRITZ, H., SCHLEUNING, W.-D., SCHIESSLER, H., SCHILL, W.-B. and V. WENDT: Seminal proteinase inhibitors and sperm acrosin: biochemistry and possible function.

In: Hafez, E.S.E. "The Human Semen and Fertility Regulation in the Male". Mosby, St.Louis, Miss., 201-216 (1976a)

GADDUM, P. and R.J. BLANDAU: Proteolytic reaction of mammalian spermatozoa on gelatin membranes.

Science 170, 749-751 (1970)

GADDUM-ROSSE, P. and R.J. BLANDAU: Comparative studies on the proteolysis of fixed gelatin membranes by mammalian sperm acrosomes.

Am.J.Anat. 134, 133-144 (1972)

GARNER, D.L., GRAVES, C.N. and O.P. SHARMA: Electrophoretic characterization of the trypsin-like activity from ejaculated and uterin incubated rabbit spermatozoa.

Biol.Reprod. 5, 84, Abs. 8 (1971)

GARNER, D.L., EASTON, M.P., MUNSON, M.E. and M.A. DOANE: Immunofluorescent localization of bovine acrosin.

J.Exp.Zoo. 191, 127-130 (1975)

GILBOA, E., ELKANA, Y. and M. RIGBI: Purification and properties of human acrosin.

Eur.J.Biochem. 39, 85-92 (1973)

GWATKIN, R.B.L., WILLIAMS, D.T., HARTMANN, J.F. and M. KNIAZUK: The zona reaction of hamster and mouse eggs:

Production in vitro by a trypsin-like protease from cortical granules.

J.Reprod.Fert. 32, 259-265 (1973)

HAENDLE, H., FRITZ, H., TRAUTSCHOLD, I. und E. WERLE: Über einen hormonabhängigen Inhibitor für proteolytische Enzyme in männlichen accessorischen Geschlechtsdrüsen und im Sperma.

Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 343, 185-188 (1965)

HAENDLE, H., INGRISCH, H. und E. WERLE: Zur Bedeutung des Proteasen-Inhibitors des Säugerspermas bei der Befruchtung und zur Frage der Identität mit dem Dekapazitationsfaktor. Klin.Wschr. 48, 824-826 (1970)

HARTMANN, J.F. and R.B.L. GWATKIN: Alteration of sites on the mammalian sperm surface following capacitation. Nature (Lond.) 234, 479-481 (1971)

HARTMANN, J.F. and C.F. HUTCHINSON: Nature of the prepene-
tration contact interactions between hamster gametes in
vitro.

J.Reprod.Fert. 36, 49-57 (1974)

HERRMANN, W.P. und G. HERMANN: Chromatographische Fraktionie-
rung und immunologische Analyse von menschlichen Spermaplasma.
Arch.klin.exp.Derm. 234, 100-116 (1969)

HIRSCHHÄUSER, C. and M. KIONKE: Prospectives of a human
seminal plasma inhibitor for trypsin.

Fertil.Steril. 22, 360-366 (1971)

HIRSCHHÄUSER, C. und S. BAUDNER: Immunologic localization
of the human seminal plasma protease inhibitor in human
spermatozoa.

Fertil.Steril. 23, 393-398 (1972)

HIRSCHHÄUSER, C., KIONKE, M., DAUME, E. and R. BUCHHOLZ:
Trypsin inhibitors in the human female genital tract.

Acta Endocr. 68, 413-416 (1971)

HO, J.J.L. und S. MEIZEL: Electrophoretic detection of multiple forms of trypsin-like activity in spermatozoa of the domestic fowl.

J.Reprod.Fert. 23, 177-179 (1970)

HO, J. and S. MEIZEL: The action of cock sperm acrosin and other hydrolytic enzymes on the vitelline membrane of the domestic fowl ovum.

Anat.Rec. 181, 533-534 (1975)

HOLSTEIN, A.F., SCHIRREN, C. and C.G. SCHIRREN: Human spermatids and spermatozoa lacking acrosomes.

J.Reprod.Fert. 35, 489-491 (1973a)

HOLSTEIN, A.F., SCHIRREN, C.G., SCHIRREN, C. und J. MAUSS: Rundköpfige Spermatozoen: eine Ursache der Infertilität des Mannes.

Dtsch.Med. Wschr. 98, 61-62 (1973b)

HUANG-YANG, Y.H.J. and S. MEIZEL: Purification of rabbit testis proacrosin and studies of its active form.

Biol.Reprod. 12, 232-238 (1975)

JOHNSON, M.P., HARRISON, R.M. und W.R. DUKELOW: Studies on the oviductal fluid and in vitro fertilization in rabbits and nonhuman primates.

Fedn.Proc. 311, 369, Abs. 278 (1972)

JONES, R.C.: The plasma membrane of ram, boar and bull spermatozoa.

J.Reprod.Fert. 33, 179-183 (1973)

KRAUSE, W. und P. GLAHN: Zur Korrelation von Ejakulatparametern mit der Fertilität.

In: Schirren, C. "Fortschritte der Andrologie", Band 3
"Fortschritte der Fertilitätsforschung II", S. 150-154.
Grosse-Verlag, Berlin 1974

LEWIS, B.K. und M.M. Ketchel: Release of hyaluronidase by rabbit sperm incubated in vitro.

Fedn.Proc. 30, 595, Abs. 2240 (1971)

MANN, TH.: Biochemistry of semen and of the male reproductive tract.

Ed.Methuen, London (1964)

MEIZEL, S.: Biochemical detection and activation of an inactive form of a trypsin-like enzyme.

J.Reprod.Fert. 31, 459-462 (1972)

MEIZEL, S. and COTHAM, J.: Partial characterization of a new bull sperm arylamidase.

J.Reprod.Fert. 28, 303-307 (1972)

MEIZEL, S. and Y.H.J. HUANG-YANG: Further studies of an inactive form of a trypsin-like enzyme in rabbit testes.

Biochem.Biophys.Res.Comm. 53, 1145-1150 (1973)

MEIZEL, S., MUKERJI, S.K. and Y.H.J. HUANG-YANG: Biochemical studies of rabbit testes and epididymal sperm proacrosin.

J.Cell.Biol. 63, Abs. 222a (1974)

METZ, C.B., SEIGUER, A.C. and A.E. CASTRO: Inhibition of the cumulus dispersing and hyaluronidase activities of sperm by heterologous and isologous antibodies (36551). Pro.Soc.Exp.Biol.Med. 140, 776-781 (1972)

MIYAMOTO, H. und M.C. CHANG: Fertilization in vitro of mouse and hamster eggs after the removal of follicular cells. J.Reprod.Fert. 30, 309-312 (1972)

MOGHISSI, K.S. and F.N. SYNER: The effect of seminal pro-tease on sperm migration through cervical mucus. Int.J.Fertil. 15, 43-49 (1970)

MORTON, D.B.: Acrosomal enzymes: immunochemical localization of acrosin and hyaluronidase in ram spermatozoa. J.Reprod.Fert. 45, 375-378 (1975)

MULTAMÄKI, S. and M. NIEMI: Zona pellucida dissolving protease in an acrosomal preparation of the bull spermatozoa. Scand.J.Clin.Lab.Invest. 23, 80 (1969)

MULATAMÄKI, S. and M. NIEMI: Trypsin-like proteolytic activity in an acrosomal extract of bull spermatozoa. Int.J.Fertil. 17, 43-52 (1972)

NICANDER, L. and A. BANE: Fine structure of the sperm head in some mammals, with particular reference to the acrosome and the subacrosomal substance. Z.Zellforsch. 72, 496-515 (1966)

OHLSSON, K.: Interaction between endogenous proteases and plasma protease inhibitors in vitro and in vivo.

In: Fritz, H. Tschesche, H., Greene, L.J. and E. Truscheit "Bayer-Symposium V, Proteinase Inhibitors" S. 96-105.

Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - New York 1974

PALM, S. and H. FRITZ: Components of the kallikrein-kinin system in human midcycle cervical mucus and seminal plasma.

In: Haberland, G.L., Rohen, J.W., Schirren, C. and P. Huber "Kininogenases. Kallikrein, 2nd Symposium on Physiological Properties and Pharmacological Rationale. Reproduction"

S. 17-21.

Schattauer-Verlag, Stuttgart - New York 1975

PALM, S., SCHILL, W.-B., WALLNER, O., PRINZEN, R. und H.

FRITZ: Occurrence of components of the kallikrein-kinin system in human genital tract secretions and their possible function in stimulation of sperm motility and migration.

Kinins: Pharmacodynamics and Biological Roles. Edited by F. Sicuteri, N. Back and G.L. Haberland. S. 271-279.

Plenum Publishing Corporation, New York 1976

PAVLOK, A. and A. McLAREN: The role of the cumulus cells and the zona pellucida in fertilization of mouse eggs in vitro.

J.Reprod.Fert. 29, 91-97 (1972)

PEDERSEN, H.: Ultrastructure of the ejaculated human sperm.

Z.Zellforsch. 94, 542-554 (1969)

PEDERSEN, H.: Further observations on the fine structure of the human spermatozoon.

Z.Zellforsch. 123, 305-315 (1972a)

PEDERSEN, H.: The acrosome of the human spermatozoon: a new method for its extraction, and an analysis of its trypsin-like enzyme activity.

J.Reprod.Fert. 31, 99-107 (1972b)

PENN, A., GLEDHILL, B.L. and Z. DARZYNKIEWICZ: Modification of the gelatin substrate procedure for demonstration of acrosomal proteolytic activity.

J.Histochem.Cytochem. 20, 499-506 (1972)

POLAKOSKI, K.L.: Partial purification and characterization of proacrosin from boar sperm. Abstract 484, S. 1308.

FASEB, (1974)

POLAKOSKI, K.L. and R.A. McRORIE: Boar acrosin II. Classification, inhibition, and specificity studies of a proteinase from sperm acrosomes.

J.Biolog.Chem. 248, 8183-8188 (1973)

POLAKOSKI, K.L. and W.L. WILLIAMS: Isolation of proteinase inhibitors from boar sperm acrosomes and boar seminal plasma and effect on fertilization.

In: Fritz, H., Tschesche, H., Greene, L.J. and E. Truscheit "Bayer-Symposium V, Proteinase Inhibitors", S. 156-163.

Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - New York 1974

POLAKOSKI, K.L., ZANEVELD, L.J. and W.L. WILLIAMS: An acrosine-acrosin inhibitor complex in ejaculated boar sperm.

Biochem.Biophys.Res.Comm. 45, 381-386 (1971)

POLAKOSKI, K.L., ZANEVELD, L.J.D. and W.L. WILLIAMS: Purification of a proteolytic enzyme from rabbit acrosomes. Biol.Reprod. 6, 23-29 (1972)

SACHS, L.: Statistische Methoden. 2. neubearb. Aufl. Springer-Verlag, Berlin-- Heidelberg - New York 1972

SCHIESSLER, H., FRITZ, H. ARNHOLD, M. FINK, E. und H. TSCHESCHE: Eigenschaften des Trypsin-ähnlichen Enzyms (Akrosin) aus Eberspermien.

Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 353, 1638-1645 (1972)

SCHIESSLER, H., ARNHOLD, M. and H. FRITZ: Characterization of two proteinase inhibitors from human seminal plasma and spermatozoa.

In: Fritz, H., Tschesche, H., Greene, L.J. and E. Truscheit "Bayer-Symposium V, Proteinase Inhibitors", S. 147-155.

Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - New York 1974

SCHIESSLER, H., ARNHOD, M. and H. FRITZ: Acid-stable proteinase inhibitors from human seminal plasma: purification and characterization.

In: Peeters, H. "Protides in the Biological Fluids", Vol. 23, S. 163-169.

Pergamon Press, Oxford 1975

SCHILL, W.-B.: Acrosin activity in human spermatozoa: methodological investigations.

Arch.Denn.Forsch. 248, 257-273 (1973a)

SCHILL, W.-B.: Der Cervixmucus und seine Bedeutung für die Andrologie. I. und II. Mitteilung.

Hautarzt 24, 417-423; 469-474 (1973b)

SCHILL, W.-B.: Quantitative determination of acrosin activity in human spermatozoa.

Fertil.Steril. 25, 703-712 (1974a)

SCHILL, W.-B.: Methodische Untersuchungen zur Akrosinaktivität in menschlichen Spermatozoen. Korrelation zwischen Akrosin und Spermatozoendichte.

In: Schirren, C. "Fortschritte der Andrologie", Band 3, "Fortschritte der Fertilitätsforschung I", S. 80-88.

Grosse-Verlag, Berlin 1974b

SCHILL, W.-B.: Die Bedeutung der proteolytischen Spermaenzyme für die Fertilität.

Hautarzt 26, 514-523 (1975a)

SCHILL, W.-B.: Gibt es zur Zeit eine medikamentöse Antikonzption beim Mann?

Gewurtsh.u.Frauenheilk. 35, 504-511 (1975b)

SCHILL, W.-B.: Influence of kallikrein on sperm count and sperm motility in patients with infertility problems: preliminary results during parenteral and oral application with special reference to asthenozoospermia and oligozoospermia.

In: Haberland, G.L., Rohen, J.W., Schirren, C. and P. Huber "Xininogenases. Kallikrein, 2nd Symposium on Physiological Properties and Pharmacological Rationale. Reproduction". S. 129-146. Schattauer-Verlag, Stuttgart - New York 1975c

SCHILL, W.-B.: Acrosin activity in human semen.

In: Hafez, E.S.E. "The Human semen and Fertility Regulation in the Male". S. 217-227.

Mosby, St.Louis, Miss. 1976a

SCHILL, W.-B.: Quantitative determination of high molecular weight serum proteinase inhibitors in human semen.

Andrologia 8, 359-364 (1976b)

SCHILL, W.-B.: Akrosin und seine Inhibitoren beim Fortpflanzungsvorgang.

Habilitationsschrift München 1976c

SCHILL, W.-B. and G.F.B. SCHUMACHER: Micro radial diffusion in gel methods for the quantitative assessment of soluble proteins in genital secretions.

In: Blandau, R.J. und K. Moghissi (Hrsg.) "The Biology of the Cervix", S 173-200.

The University of Chicago Press, Chicago 1973

SCHILL, W.-B. and G.L. HABERLAND: Kinin-induced enhancement of sperm motility.

Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 355, 229-231 (1974)

SCHILL, W.-B. and H.H. Wolff: Acrosin activity and acrosome ultrastructure of human spermatozoa after freeze preservation.

Naturwissenschaften 61, 172 (1974a)

SCHILL, W.-B. und H.H. WOLFF: Kombinierte biochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen an Kryosperma zur Frage der Lokalisation der Akrosinaktivität. 30ste Tagung der Deutsch.Dermatolog.Ges., Graz. Supplementum I zu "Der Hautarzt", 173-174, (1974b)

SCHILL, W.-B. and H.H. WOLFF: Ultrastructure of human sperm acrosome and determination of acrosin activity under conditions of semen preservations.

Int.J.Fertil. 19, 217-223 (1974c)

SCHILL, W.-B. and H. FRITZ: Benzoyl-L-arginin-ethyl-ester splitting activity (Acrosin) in human spermatozoa and seminal plasma during aging in vitro.

Hoppe Seyler's Z.Physiol.Chem. 356, 83-90 (1975)

SCHILL, W.-B., BRAUN-FALCO, O. and G.L. HABERLAND: The possible role of kinins in sperm motility.

Int.J.Fertil. 19, 163-167 (1974)

SCHILL, W.-B., SCHLEUNING, W.-D., FRITZ, H., WENDT, V. und N. HEIMBURGER: Immunofluorescent localization of acrosin in spermatozoa by boar acrosin antibodies.

Naturwissenschaften 62, 540-541 (1975a)

SCHILL, W.-B., HEIMBURGER, N., SCHIESSLER, H., STOLLA, R. and M. FRITZ: Reversible attachment and localization of the acidstable seminal plasma acrosin-trypsin inhibitors on boar spermatozoa as revealed by the indirect immunofluorescent staining technique.

Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 356, 1473-1476 (1975b)

SCHILL, W.-B., WALLNER, O., PALM, S. and H. FRITZ: Stimulation of sperm motility and sperm migration in cervical mucus by kinins.

In: Hafez, E.S.E. "The Human Semen and Fertility Regulation in the Male". S. 442-451.

Mosby St.Louis, Miss., 1976b

SCHIRREN, C.: Praktische Andrologie.

Hartmann, Berlin 1971

SCHIRREN, J.M.: Zur Bedeutung der Normwerte des Ejakulats für die Zeugungsfähigkeit.

Z.Hautkr. 50, 97-103 (1975)

SCHIRREN, C. und A. FWEIS: Akrosinaktivität in menschlichen Spermatozoen und Spermatozoendichte im Ejakulat.

Andrologie 5, 81-83 (1973)

SCHLEUNING, W.-D.: Isolierung und Charakterisierung von Akrosin, einem proteolytischen Enzym aus Eberspermien.

Inauguraldissertation, München 1975

SCHLEUNING, W.-D. and H. FRITZ: Some characteristics of highly purified boar sperm acrosin.

Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 355, 125-130 (1974)

SCHLEUNING, W.-D. and H. FRITZ: Sperm acrosin.

In: Methods in Enzymology, Band 45 "Proteolytic Enzymes", S. 330-342 (1976)

SCHLEUNING, W.-D., SCHIESSLER, H. und H. FRITZ: Highly purified acrosomal proteinase (boar acrosin): isolation by affinity chromatography using benzamidine-cellulose and stabilization.

Hoppe-Seyler's Z.Physiol. Chem. 354, 550-554 (1973)

SCHLEUNING, W.-D., HELL, R. and H. FRITZ: Multiple forms of boar acrosin and their relationship to proenzyme activation.

Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 357, 207-212 (1976a)

SCHLEUNING, W.-D., HELL, R. und H. FRITZ: Multiple forms of human acrosin: isolation and properties.

Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem.Bd. 357, S. 855-865 (1976b)

SCHUMACHER, G.F.B.: Alpha₁-antitrypsin in genital secretions.

In: Tyler, E.T. "Progress in Conception Control 1969",

S. 13-21. J.B. Lippincott Co., Philadelphia and Toronto, 1969

SCHUMACHER, G.F.B.: Alpha₁-antitrypsin in uterine secretions.

In: Fritz, H. and H. Tschesche "Prov.Int.Res.Conf.Proteinase

Inhibitors, Munich 1970, S. 253-256, Walter de Gruyter,

Berlin - New York 1971

SCHUMACHER, G.F.B.: Soluble proteins of human cervical mucus.

In: Elstein, M., Moghissi, K.S. and R. Borth "Cervical Mucus

in Human Reproduction". S. 93-113. Scriptor, Copenhagen 1973

SCHUMACHER, G.F.B. and L.J.D. ZANEVELD: Proteinase inhibitors

in human cervical mucus and their in vivo interaction with

human acrosin.

In: Fritz, H., Tschesche, H., Greene, L.J. and E. Truscheit

"Bayer-Symposium V, Proteinase Inhibitors", S. 178-186.

Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - New York 1974

SOUPART, P. and P.A. STRONG: Ultrastructural observations

on human oocytes fertilized in vitro.

Fertil.Steril. 25, 11-44- (1974)

SRIVASTAVA, P.N., ADAMS, C.E. and E.F. HARTREE: Enzymic

action of acrosomal preparations on the rabbit ovum in vitro.

J.Reprod.Fert. 10, 61-67 (1965)

SRIVASTAVA, P.N., MUNELL, J.F., YANG, C.H. and C.W. FOLEY:
Sequential release of acrosomal membranes and acrosomal
enzymes of ram spermatozoa.

J.Reprod.Fert. 36, 363-372 (1974)

STAMBAUGH, R. and J. BUCKLEY: Zona pellucida dissolution.
Enzymes of the rabbit sperm head.

Science 161, 585-586 (1968)

STAMBAUGH, R. and J. BUCKLEY: Identification and subcellular
localization of the enzymes effecting penetration of the
zona pellucida by rabbit spermatozoa.

J.Reprod.Fert. 19, 423-432 (1969)

STAMBAUGH, R. and J. BUCKLEY: Studies on acrosomal proteinase
of rabbit spermatozoa.

Biochem.Biophys.Acta 284, 473-477 (1972)

STAMBAUGH, R. and M. SMITH: Amino acid content of rabbit
acrosomal proteinase and its similarity to human trypsin.

Science 186, 745-746 (1974)

STAMBAUGH, R., SEITZ, H.M. and L. MASTROIANNI: Acrosomal
proteinase inhibitors in rhesus monkey (*Macaca mulatta*)
oviduct fluid.

Fertil.Steril. 25, 352-357 (1974)

SUOMINEN, J.J.O. and M. NIEMI: Human seminal trypsin
inhibitors.

J.Reprod.Fert. 29, 163-172 (1972)

SUOMINEN, J., KAUFMAN, M.H. and B.P. SETCHELL: Prevention of fertilization in vitro by an acrosin inhibitor from rete testis fluid of the ram.

J.Reprod.Fert. 34, 385-388 (1973)

TEICHMAN, R.J. and M.H. BERNSTEIN: Fine structure localization of acid phosphatase in rabbit and bull sperm heads.

J.Reprod.Fert. 27, 243-248 (1971)

TÖRÖK, L.: Darstellung der proteolytischen Aktivität von Spermien mit Hilfe der Gelatine-Substrat-Methode.

Andrologia 6, 341-346 (1974)

TRAUTSCHOLD, I. und E. WERLE: Spektrophotometrische Bestimmung des Kallikreins und seiner Inaktivatoren.

Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 325, 48-59 (1961)

TRAUTSCHOLD, I., WERLE, E. und G. SCHWEITZER: Kallikrein.

In: Bergmeyer, H.U. "Methoden der enzymatischen Analyse".

S. 1011-1020. Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. 1970

TSCHESCHE, H., KUPFER, S., LENGEL, O., KLAUSER, R., MEIER, M. and H. FRITZ: Purification, characterization, and structural studies of proteinase inhibitors from boar seminal plasma and boar spermatozoa.

In: Fritz, H., Tschesche, H., Greene, L.J. and E. Truscheit "Bayer-Symposium V, Proteinase Inhibitors", S. 164-177.

Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - New York 1974

UHLENBRUCK, G., SPRENGER, I., SCHUMACHER, G.F.B. and L.J.D. ZANEVELD: Additional properties of acrosin, a proteolytic enzyme from rabbit sperm acrosomes.

Naturwissenschaften 59, 124-125 (1971)

VACQUIER, U.D., TEGNER, J.M. and D. EPEL: Protease activity establishes the block against polyspermy in sea urchin eggs. Nature (Lond.) 240, 352-353 (1972)

WALDSCHMIDT, M., HOFFMANN, B. und H. KARG: Untersuchungen über die tryptische Enzymaktivität in Geschlechtssekreten von Bullen.

Zuchthygiene 1, 15-21 (1966)

WALLNER, O. and H. FRITZ: Characterization of an acid-stable proteinase inhibitor in human cervical mucus.

Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 355, 709-715 (1974)

WALLNER, O., FRITZ, H. and K. HOCHSTRASSER: An acid-stable proteinase inhibitor in human cervical mucus.

In: Peeters, H. "Protides in the Biological Fluids", Band 23, S. 177-182

Pergamon Press, Oxford 1975

WENDT, V.: Akrosinbestimmung bei Bullenspermien unter besonderer Berücksichtigung des einzelnen Spermiums.

Inauguraldissertation München 1974

WENDT, V., LEIDL, W. and H. FRITZ: The lysis effect of bull spermatozoa on gelatin substrat film. Methodological investigations.

Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 356, 315-323 (1975a)

WENDT, V., LEIDL, W. and H. FRITZ: The influence of various proteinase inhibitors on the gelatinolytic effect of ejaculated and uterine boar spermatozoa.

Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 356, 1073-1078 (1975b)

WENDT, V., LEIDL, W. und W.-B. SCHILL: Methodische Untersuchungen zur Gelatinolyse durch Spermien.

In: Schirren, C. "Fortschritte der Andrologie", Band 5
"Fortschritte der Fertilitätsforschung III" S. 181-188.
Grosse-Verlag, Berlin 1975c

WESTFALL, F.D. and G.C. HARRIS: Proteolytic digestion technique for evaluating freeze-induced damage to acrosomes of chicken spermatozoa.

Cryobiology 11, 255-259 (1974)

WILLIAMS, W.L., ROBERTSON, R.T. and W.R. DUKELOW: Decapacitation factor and capacitation.

In: Advances in the Biosciences 4, 61
Pergamon Press (1969)

WOLFF, M.H. and W.B. SCHILL: Ultrastructural study of human sperm acrosome during acetic extraction of acrosin.

J.Reprod.Fert. 42, 385-387 (1975)

WOLFF, M.H., SCHILL, W.-B. und P. MORITZ: Rundköpfige Spermatozoen - ein seltener andrologischer Befund ("Kugelpfpermatozoen"), Hautarzt, 27, 111-116 (1976)

YANAGIMACHI, R.: The fertilization of guinea pig eggs in vitro. The Anatomical Record 174, 9-19 (1972)

YANAGIMACHI, R. and Y.P. NODA: Acrosome loss in fertilizing mammalian spermatozoa: A rebuttal of criticism.

J.Ultrastruct.Res. 39, 217-221 (1972)

YANAGIMACHI, R. and R.J. TEICHMAN: Cytochemical demonstration of acrosomal proteinase in mammalian and avian spermatozoa by a silver proteinate method.

Biol.Reprod. 6, 87-97 (1972)

YANG, S.-L., ZANEVELD, L.J.D. and G.F.B. SCHUMACHER: Effect of serum proteinase inhibitors on fertilizing capacity of rabbit spermatozoa.

Fertil.Steril. 27, 577-581 (1976)

ZANEVELD, L.J.D.: Sperm acrosomal enzymes and their potential for contraceptive development.

In: Hafez, E.S.E. and C.G. Thibault "Sperm transport, survival and fertilizing ability in vertebrates, S. 435-450, INSERM, Paris 1974

ZANEVELD, L.J.D. and W.L. WILLIAMS: A sperm enzyme that disperses the corona radiata and its inhibition by decapacitation factor.

Biol.Reprod. 2, 363-368 (1970)

ZANEVELD, L.J.D., STRIVASTAVA, P.N. and W.L. WILLIAMS: Relationship of a trypsin-like enzyme in rabbit spermatozoa to capacitation.

J.Reprod.Fert. 20, 337-339 (1969)

ZANEVELD, L.J.D., SRIVASTAVA, P.N. and W.L. WILLIAMS: Inhibition by seminal plasma of acrosomal enzymes in intact sperm.

Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 133, 1172-1174 (1970a)

ZANEVELD, L.J.D., ROBERTSON, R.T. and W.L. WILLIAMS:
Synthetic enzyme inhibitors as antifertility agents.
FEBS LETTERS 11, 345-347 (1970b)

ZANEVELD, L.J.D., POLAKOSKI, K.L., ROBERTSON, R.T. and W.L.
WILLIAMS: Trypsin inhibitors and fertilization.
In: Fritz, H. and H. Tschesche "Proc.Int.Res.Conf.Proteinase
Inhibitors, Munich, Nov. 1970". S. 236-244. Walter de
Gruyter, Berlin - New York 1971a

ZANEVELD, L.J.D., ROBERTSON, R.T., KESSLER, M. and W.L.
WILLIAMS: Inhibition of fertilization in vivo by pancreatic
and seminal plasma trypsin inhibitors.
J.Reprod.Fert. 25, 387-392 (1971b)

ZANEVELD, L.J.D., POLAKOSKI, K.L., FOLEY, C.W. and W.L.
WILLIAMS: The role of acrosin, an acrosomal protease and
acrosin inhibitors in capacitation of sperm.
Fedn.Proc. 30, 2241, Abs. 595 (1971c)

ZANEVELD, L.J.D., DRAGOJE, B.M. and G.F.B. SCHUMACHER:
Acrosomal proteinase and proteinase inhibitor of human
spermatozoa.
Science, 177, 702-703 (1972a)

ZANEVELD, L.J.D., POLAKOSKI, K.L. and W.L. Williams:
Properties of acrosin, a proteolytic enzyme from rabbit
sperm acrosomes.
Biol.Reprod. 6, 30-39 (1972b)

ZANEVELD, L.J.D., POLAKOSKI, K.L. and W.L. WILLIAMS:
A proteinase and proteinase inhibitor of mammalian sperm
acrosomes.

Biol.Reprod. 9, 219-225 (1973a)

ZANEVELD, L.J.D., SCHUMACHER, G.F.B. and J. TRAVIS:
Human sperm acrosomal proteinase: antibody inhibition and
immunologic dissimilarity to human pancreatic trypsin.

Fertil.Steril. 24, 479-484 (1973b)

ZANEVELD, L.J.D., POLAKOSKI, K.L. and G.F.B. SCHUMACHER:
Properties of acrosomal hyaluronidase from bull spermato-
zoa: Evidence for its similarity to testicular hyaluronidase.

J.Biol.Chem. 248, 564-570 (1973c)

ZANEVELD, L.J.D., SCHUMACHER, G.F.B., TAUBER, P.F. and
D. PROPPING: Proteinase inhibitors and proteinases of human
semen.

In: Fritz, H., Tschesch, H., Greene, L.J. and E. Truscheit
"Bayer Symposium V, Proteinase Inhibitors", S. 136-146.

Springer-Verlag, Berlin - Heidelberg - New York (1974)

Abschließend möchte ich Herrn Privatdozent Dr. med. W.-B. SCHILL für die Überlassung des Themas und die stets hilfsbereite Beratung bei Anfertigung der Arbeit herzlich danken.

Mein Dank gilt außerdem Dr. V. WENDT, ehemaliger Mitarbeiter der Abteilung für Andrologie und künstliche Besamung an der gynäkologischen und ambulatorischen Tierklinik der Universität München, für die bereitwillige Einarbeitung in die Methode der Gelatinolyse.

Schließlich sei den medizinisch-technischen Assistentinnen der andrologischen Abteilung an der Dermatologischen Klinik der Universität München gedankt, die mir in allen technischen Belangen unterstützend zur Seite standen.

Lebenslauf

Am 16. Oktober 1950 wurde ich als Sohn des Bilanzbuchhalters Kaspar Graßl und seiner Ehefrau Therese Graßl, geb. Blümel, in Dachau geboren. In Dachau besuchte ich die Grundschule und schloß am mathematisch-naturwissenschaftlichen Gymnasium Dachau 1971 meine Schulzeit mit dem Abitur ab. Im Wintersemester 1971 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Fakultät der Universität München. Nach Abschluß der ärztlichen Prüfung wurde mir am 8. Mai 1978 die Approbation als Arzt erteilt. Im Juni 1978 heiratete ich Fräulein Ines Waltinger. Seit 1. Juli 1978 bin ich als Assistenzarzt auf der II. Medizinischen Abteilung des Krankenhauses München-Schwabing tätig.

